

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1936-37

N° 22

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE TOXICOLOGIQUE DU BENZÈNE

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le 19 Juin 1937

par

Pierre LAURIAN

Pharmacien

Licencié ès-sciences

Ex-interne des Hôpitaux de Paris

JURY { MM. LEBEAU, *Président.*
FABRE, *Professeur.*
FLEURY, *Agrégé.*

LILLE
IMPRIMERIE L. DANIEL

—
1937

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE TOXICOLOGIQUE
DU BENZÈNE**



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1936-37

N° 22

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE TOXICOLOGIQUE DU BENZÈNE

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris
(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le 19 Juin 1937

par

Pierre LAURIAN

Pharmacien

Licencié ès-sciences

Ex-interne des Hôpitaux de Paris

JURY { MM. LEBEAU, *Président.*
FABRE, *Professeur.*
FLEURY, *Agrégé.*

LILLE
IMPRIMERIE L. DANIEL

1937

PERSONNEL DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE PARIS

ADMINISTRATION

MM. GUÉRIN, *Doyen*, O. ✱, ☉ I.
 P. LEBEAU, *Assesseur*, O. ✱, ☉ I.
 P. DESPORT, *Secrétaire*, ✱, ☉ I.

PROFESSEURS

MM. GUÉRIN, O. ✱, ☉ I.	Botanique générale.
PERROT, C. ✱, ☉ I.	Histoire naturelle des médicaments.
COUTIÈRE, O. ✱, ☉ I.	Zoologie.
LEBEAU, O. ✱, ☉ I, <i>Membre de l'Institut</i> ...	Pharmacie chimique.
BOUGAULT, O. ✱, ☉ I.	Chimie analytique.
GORIS, O. ✱, ☉ I.	Pharmacie galénique.
TASSILLY, O. ✱, ☉ I.	Physique.
DAMIENS, ✱, ☉ I.	Chimie minérale.
HÉRISSEY, O. ✱, ☉ I.	Chimie biologique.
SOMMELET, ✱, ☉ I.	Chimie organique.
LUTZ, ✱, ☉ I.	Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, ✱, ☉ I.	Toxicologie.
LAUNOY, O. ✱, ☉ I.	Professeur sans chaire.

Doyen honoraire : M. RADAIS, O. ✱, ☉ I.

Professeurs honoraires :

MM. BÉHAL, G. O. ✱, ☉ I. et DELÉPINE, O. ✱, ☉ I., membres de l'Institut
 et GUERBET, ✱, ☉ I.

CHARGÉS DE COURS

MM. Marc HONNORAT, ✱, ☉ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
LAUNOY, O. ✱, ☉ I.	Pharmacodynamie.
DELABY, ✱, ☉ I.	Hydrologie et Hygiène.
PICON, ☉ I.	Minéralogie.
BACH, ☉ I.	Microbiologie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. DELABY, ✱, ☉ A.	MM. BACH, ☉ I.
PICON, ☉ I.	BEDEL, ☉ I.
MASCRÉ, ☉ I.	RÉGNIER, ☉ I.
FLEURY, ☉ I.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. BEDEL, ☉ I, <i>agrégé</i> , chargé des T. P. de 1 ^{re} année...	Chimie générale.
FLEURY, ☉ I. et RÉGNIER, ☉ I. : <i>agrégés</i> , chargés	des travaux de Chimie analytique.
SOUÈGES, ☉ I.	Micrographie.
LEROUX, ✱, ☉ I.	Physique.
DEVAL, ✱, ☉ I.	Microbiologie.
DELABY, ✱, ☉ I, PICON, ☉ I. et MASCRÉ, ☉ I. :	

agrégés, chargés des travaux généraux de 4^e année.

Bibliothécaire en Chef : M. GARNIER, ☉ A.



A MES PARENTS

*Je dédie ce travail, en faible gage de
ma reconnaissance et de mon affection.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR P. LEBEAU

Membre de l'Institut,
Professeur de Pharmacie Chimique
à la Faculté de Pharmacie de Paris,
Officier de la Légion d'Honneur.

*En témoignage de profonde reconnais-
sance et de respectueux attachement.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR RENÉ FABRE

Professeur de Toxicologie à la Faculté de Pharmacie de Paris
et à l'Institut d'Hygiène Industrielle et de Médecine
du Travail de la Faculté de Médecine de Paris,
Pharmacien en Chef du Groupe Hospitalier
Necker-Enfants-Malades,
Chevalier de la Légion d'Honneur.

*Hommage de profonde gratitude et
d'entier dévouement.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ FLEURY

Pharmacien en Chef des Asiles de la Seine.

Hommage respectueux.

MEIS ET AMICIS

INTRODUCTION

L'étude toxicologique du benzène qui nous a été proposée par M. le Professeur René FABRE, comme sujet de recherches, nous a permis d'apporter une modeste contribution à une branche importante de la toxicologie : l'Hygiène industrielle.

La découverte du benzène fut faite par FARADAY, en 1825. L'emploi de ce corps se généralisant, sa toxicité apparut rapidement et les cas d'intoxication devinrent nombreux. Ils se multiplièrent lorsque l'utilisation du benzène s'étendit et c'est ainsi qu'en Suisse, dans le canton de Lucerne, on relevait, en 1918, 37 intoxications industrielles dues à ce composé.

En 1922, dans une fabrique allemande de chaussures en caoutchouc, 22 ouvriers présentèrent des accidents plus ou moins graves de benzénisme. Enfin, au cours des dix dernières années, on a enregistré, en Allemagne, 127 intoxications professionnelles, dont 15 mortelles, et en Angleterre 144, dont 10 mortelles.

Ces chiffres montrent suffisamment tout l'intérêt qui s'attache à l'étude toxicologique du benzène.

La littérature, tant française qu'étrangère, abonde en publications sur ce sujet, mais la plupart n'ont pour objet que la description clinique de cas d'intoxication. Il en est peu qui constituent une revue d'ensemble.

D'autre part, une regrettable confusion existe du fait que, selon les pays, le mot « benzine » s'applique au benzène ou au pétrole léger.

C'est pourquoi nous devons, dès maintenant, indiquer, qu'au cours de notre travail, nous désignerons, en accord avec de nombreux auteurs, par :

benzénisme : l'intoxication par le benzène pur,

benzolisme : celle produite par le mélange du benzène et de ses homologues supérieurs : toluène et xylène, mélange impur couramment désigné sous le nom de benzol,

pétrolisme : l'intoxication provoquée par l'essence, mélange de divers hydrocarbures dérivés du pétrole.

Nous avons tenté, au cours de ce travail, de reproduire chez l'animal les symptômes, aujourd'hui classiques de l'intoxication benzénique chez l'homme, afin d'en étudier le mécanisme.

Nous avons été amené à rechercher la localisation du benzène dans l'organisme, celle-ci pouvant expliquer les symptômes de l'intoxication. Mais il nous a fallu, pour cela, mettre au point un dosage du benzène dans les viscères ce qui n'a pas été une des moindres parties de notre travail.

Nous désirions, en outre, étudier l'action du benzène sur la composition du sang, afin de rechercher si les variations de l'un des constituants ne pourraient pas servir de test de l'intoxication benzénique.

Ceci nous a conduit à réaliser, d'une part, des intoxications aiguës, d'autre part, des intoxications chroniques. Nous avons suivi les unes et les autres en pratiquant des examens hématologiques répétés et des dosages fréquents des principaux éléments du sang.

Le plan que nous suivrons dans notre exposé est le suivant :

Introduction.

PREMIÈRE PARTIE. — **Généralités.**

DEUXIÈME PARTIE. — **Identification et dosage du benzène en toxicologie.**

I. — TECHNIQUES DE DOSAGE DU BENZÈNE APPLICABLES A LA TOXICOLOGIE.

II. — MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE SPECTROGRAPHIQUE DE DOSAGE DU BENZÈNE DANS L'ATMOSPÈRE, LE SANG ET LES ORGANES.

TROISIÈME PARTIE. — **Intoxications expérimentales.**

I. — TOXICITÉ COMPARÉE DU BENZÈNE ET DE SES HOMOLOGUES. CHOIX DU TOXIQUE UTILISÉ DANS NOS EXPÉRIENCES.

II. — INFLUENCE DE LA VOIE D'INTRODUCTION. CHOIX DU MODE D'INTOXICATION.

III. — DISPOSITIF UTILISÉ POUR L'INTOXICATION PAR INHALATION.

IV. — CHOIX DE L'ANIMAL.

V. — DOSES DE BENZÈNE UTILISÉES POUR LES INTOXICATIONS EXPÉRIMENTALES.

VI. — TECHNIQUES HÉMATOLOGIQUES ET CHIMIQUES UTILISÉES.

VII. — INTOXICATIONS AIGUËS.

VIII. — INTOXICATIONS CHRONIQUES.

IX. — SORT DU BENZÈNE DANS L'ORGANISME.

A. Localisation.

B. Elimination.

Conclusions.

* * *

M. le Professeur LEBEAU a bien voulu nous guider au cours de nos études et nous a toujours témoigné un bienveillant intérêt ; nous lui en sommes profondément reconnaissant. Qu'il soit assuré ici de notre respectueuse admiration et de notre entier dévouement. C'est à ses conseils que nous devons de

compléter notre éducation pharmaceutique en effectuant une thèse au Laboratoire de M. le Professeur René FABRE, notre Maître d'Internat. Nous avons pu ainsi continuer à profiter des enseignements journaliers qu'il nous a inlassablement prodigués.

Pour le bienveillant intérêt qu'il nous a témoigné au cours de nos quatre années d'Internat et pour les judicieux conseils qu'il nous a donnés lors de la préparation de notre thèse, nous exprimons à M. le Professeur René FABRE notre vive gratitude et notre respectueuse reconnaissance.

M. le Professeur FLEURY nous a donné une nouvelle preuve d'intérêt en acceptant de faire partie du jury de cette thèse. Nous l'en remercions bien sincèrement.

M^{lle} Marie-Thérèse REGNIER, nous a apporté au cours de ce travail une aide de tous les instants. Grâce à sa précieuse collaboration, nous avons pu mener à bien la partie physiologique de cette thèse. Nous l'assurons de notre profonde et bien amicale reconnaissance.

M. CHÉRAMY, Assistant de toxicologie, Pharmacien en Chef de l'hôpital Boucicaut, nous a guidé au début de nos recherches ; nous lui exprimons notre vive gratitude.

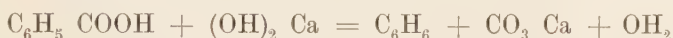
M. L. AMY a bien voulu nous initier à la technique spectrographique ; nous le prions d'accepter nos remerciements sincères.

Nous remercions vivement le Conseil de la Faculté de Pharmacie pour le legs Moissan qui nous a été attribué pour l'année 1935-1936.

PREMIÈRE PARTIE

GÉNÉRALITÉS

Le benzène a été découvert, en 1825, par FARADAY qui l'isola des produits de distillation d'un liquide résultant de la compression d'un gaz d'éclairage obtenu à partir de certaines huiles. En 1834, MITSCHERLICH l'obtint par chauffage d'un mélange d'acide benzoïque et de chaux en excès :

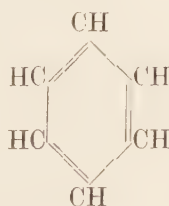


Il en détermina la composition, mesura sa tension de vapeur et le nomma « benzine ».

Peu après, LIEBIG proposa, pour ce corps, la dénomination de « benzol » et LEIGH, en 1842, signala sa présence dans le goudron, fait qui fut confirmé par HOFFMANN.

Enfin, en 1866, BERTHELOT réalisa la synthèse du benzène par polymérisation de l'acétylène.

Le benzène est le premier terme des carbures benzéniques. Plusieurs formules de constitution ont été proposées, mais celle universellement adoptée est due à KÉKULÉ. Elle fait du benzène un carbure possédant une chaîne fermée hexagonale, à trois doubles liaisons :



Le benzène est un liquide incolore, mobile et très réfringent. Il possède une odeur forte, spéciale, mais non désagréable. Sa

densité est de 0,868 à $+ 20^{\circ}$, ses vapeurs sont plus denses que l'air, son point d'ébullition est de $80^{\circ}2$, son point de fusion de $5^{\circ}5$ et son indice de réfraction, à 20° , de 1,50439. Le benzène est très inflammable, il brûle avec une flamme fuligineuse et éclairante.

Il est à peu près insoluble dans l'eau. Dans les mélanges d'eau et d'alcool, la solubilité augmente avec le titre alcoolique. Il est miscible à l'alcool absolu, l'éther, le chloroforme, le sulfure de carbone. Il dissout le brome, l'iode, le soufre, le phosphore, les huiles grasses et les huiles volatiles, le caoutchouc, la gutta-percha, la cire, diverses résines et un grand nombre d'alcaloïdes.

Le benzène est un constituant d'un certain nombre de pétroles et en particulier de ceux de Bornéo qui fournissent, par distillation, des huiles légères riches en benzène.

On l'extrait des huiles légères, obtenues lors de la distillation du goudron de houille ; cette source est la plus ancienne et la plus courante.

On l'obtient aussi par le « débenzolage » du gaz d'éclairage dont le pouvoir éclairant n'est dû, que pour une faible part, à la combustion des gaz qu'il renferme (hydrogène, méthane, oxyde de carbone) ; c'est la présence de carbures cycliques volatils et notamment du benzène qui, en réalité, lui communique cette propriété.

En raison de la valeur marchande du benzol, on songea à l'extraire du gaz des fours à coke et CARVÈS, en 1884, fit breveter un procédé qui consiste à faire barboter le gaz dans des huiles lourdes qui fixent le benzol.

Dans les usines à gaz, le débenzolage, diminuant le pouvoir éclairant du gaz produit, n'était pas effectué jusqu'à la guerre de 1914-1918. A cette époque, en raison des besoins en benzol, cette opération fut rendue obligatoire dans les cokeries et les usines à gaz.

Cette mesure fut rapportée en 1918, mais rétablie en 1923.

Que le benzol soit extrait du goudron ou retiré du gaz d'éclairage, il subit, avant d'être livré à l'industrie, une purification

relative l'amenant à l'un des deux types commerciaux suivants :

1^o Benzol à 90 (90 p. 100 distillant au-dessous de 100° et le reste entre 100° et 120°).

Il renferme de 80 à 85 p. 100 de benzène, 13 p. 100 de toluène et 2 à 5 p. 100 de xylène, ainsi que de petites quantités d'impuretés : sulfure de carbone, pentane, thiophène et des traces d'eau.

2^o Benzol à 50 (50 p. 100 distillant au-dessous de 100°, le reste entre 100° et 140°).

Il contient de 40 à 50 p. 100 de benzène, le reste étant constitué par le mélange des homologues supérieurs et des impuretés.

Nous allons envisager successivement les intoxications industrielles et leur prophylaxie, puis les intoxications thérapeutiques, beaucoup plus rares.

INTOXICATIONS INDUSTRIELLES.

L'industrie du benzol s'est tout d'abord développée en Allemagne, où l'on utilisait ce corps pour la préparation du phénol, de l'aniline et des matières colorantes et produits chimiques qui en dérivent.

En 1914, les nécessités de la défense nationale obligèrent les belligérants à développer la production du benzène. L'Amérique, l'Angleterre et la France montèrent des usines. Après la guerre, ces pays durent trouver des débouchés pour le benzol désormais produit sur une grande échelle.

C'est de cette époque que date la généralisation de l'emploi du benzol comme solvant industriel en raison de ses propriétés dissolvantes supérieures à celles de l'essence de pétrole.

C'est de cette époque également que date l'accroissement du nombre des accidents dus à son emploi, augmentation telle que l'on peut placer le benzène, à côté du plomb, parmi les plus importants toxiques industriels.

Le benzène, en effet, est très volatil et l'inhalation de ses vapeurs peut produire des intoxications chroniques ou des intoxications aiguës et subaiguës, parfois mortelles.

Toutes les fois que ce corps sera utilisé et que des mesures de protection suffisantes ne seront pas prises, on pourra déplorer des accidents, que ce soit au cours de sa fabrication ou lors de son emploi industriel. Nous allons rapidement rechercher les sources d'intoxications benzéniques et tout d'abord examiner comment celles-ci peuvent se produire au cours de la fabrication.

Notons que les intoxications sont assez rares dans les installations modernes où l'appareillage est plus perfectionné et l'ouvrier mieux protégé. Toutefois, à la suite d'un fonctionnement défectueux, on peut observer, chez les ouvriers, de la céphalée et des vertiges. Quant aux cas graves ou mortels, ils sont presque toujours dus à des erreurs de manipulation : nettoyage ou réparation de chaudières ou réservoirs insuffisamment ventilés, ou encore à des accidents fortuits, tels que fuite dans une canalisation, explosion d'un appareil.

Plus fréquentes sont les intoxications se produisant lors de l'utilisation industrielle du benzène.

On l'utilise, soit lors de la préparation de divers composés chimiques : nitrobenzène, phénols, aniline et couleurs d'aniline, matières colorantes, produits pharmaceutiques, parfums, explosifs... soit comme carburant, concurremment avec l'essence de pétrole. Mais ce sont surtout ses propriétés dissolvantes qui sont mises à profit dans de très nombreuses industries : industrie des graisses, des engrais, industries textiles, industrie des chaussures, du cuir artificiel, fabriques de plumes, de chapeaux de paille, industrie du linoléum, du celluloïd, des laques, fabriques d'appareils électriques, industrie de la peinture, du bronzage, de la dorure.

Dans l'industrie des imperméables gommés on emploie des solutions, au 1/5, de caoutchouc dans le benzène et chaque ouvrier manipule, en moyenne, 300 à 350 g. de benzène par jour.

Les propriétés dissolvantes du benzène sont également utilisées pour la préparation de produits à « séchage rapide », répandus dans le commerce sous des noms de fantaisie, et pour l'obtention du vernis à l'acétate de cellulose, employé dans l'industrie aéronautique ou automobile et pour enduire l'intérieur des réservoirs

ou des cuves. Notons aussi son emploi dans l'industrie de la teinture et du dégraissage et nous n'aurons donné qu'une faible idée de la multiplicité des usages du benzène et, malheureusement aussi, des causes possibles d'intoxication.

Dans «The Lancet», en 1862, sous le titre «Un nouveau poison industriel», on trouve la description d'un cas mortel d'intoxication par inhalation de vapeurs, et ingestion d'un liquide contenant du benzène. Aussitôt après l'absorption, on observa de la somnolence, puis l'apparition de cyanose, l'affaiblissement du pouls et la mort. L'autopsie révéla de la congestion de différents organes et des taches hémorragiques sur la muqueuse gastrique.

La première description d'une intoxication chronique est due à C. G. SANTESSON [177] qui, en 1897, rapporta 9 cas, dont 4 mortels, survenus chez des ouvriers manipulant un mélange adhésif à base de benzène, dans une usine de pneus de bicyclettes, à Upsala en Suède.

Le début en fut insidieux et les symptômes n'attirèrent l'attention que lorsque les malades furent dans un état grave.

L'auteur nota des maux de tête, de l'inappétence, de la fatigue, des vomissements de sang, des hémorragies des muqueuses nasales, gingivales, vaginales et l'existence de taches purpuriques sur la peau.

La même année, LENOIR et CLAUDE [135], en France, décrivirent un cas analogue chez un ouvrier travaillant dans une teinturerie. En 1907, L. LEWIN [139] rapporta un cas typique d'intoxication aiguë produite au cours du nettoyage d'une cuve qui avait contenu un mélange de naphthaline et de benzène. Ce récipient, vide depuis 24 heures, avait été lavé à plusieurs reprises et, malgré ces précautions, l'ouvrier fut gravement intoxiqué.

L. SELLING [185], en 1910, rapporta trois cas d'intoxication chronique, dont deux se terminèrent par la mort. Il montra que ce n'est pas l'hémorragie qui caractérise essentiellement l'intoxication chronique, mais la diminution massive du taux des globules blancs aboutissant à la leucopénie.

Depuis lors, les observations cliniques d'intoxications benzé-

niques se sont multipliées. J. RAMBOUSEK [173] pouvait déjà, en 1910, grouper 22 cas d'intoxications aiguës, et actuellement les cas décrits d'intoxications aiguës ou chroniques se chiffrent par centaines.

C'est ainsi que ADLER-HERZMARK [1] cite 27 cas d'intoxication benzénique, dont 5 mortels, survenus, en 1931, dans une usine de Wiener-Neustadt (Autriche). H. DIMMEL [42], en 1933, signale dans une usine allemande, 66 cas d'intoxication dus au benzène, dont 15 graves et 5 mortels.

La même année, G. DUMAS [46] relate une intoxication benzénique survenue dans une importante fabrique de chaussures des environs de Nancy. Dans cette usine, occupant 600 ouvriers et ouvrières, plus de trente cas de purpura, avec dermatites, hémorragies, asthénie, furent constatés et attribués au benzène ; sept furent mortels.

Ces descriptions cliniques ont attiré l'attention des toxicologues et ont suscité de nombreuses recherches expérimentales qui ont contribué à éclairer la pathogénie de l'intoxication benzénique. Déjà C. G. SANTESSON [177], après avoir observé les accidents précédemment indiqués, tenta de reproduire l'intoxication sur des Lapins, en utilisant comme voie d'introduction, les voies cutanée, sous-cutanée et respiratoire.

L'intoxication n'a pu être reproduite par voie respiratoire ; par contre, par voie cutanée (application sur la peau rasée d'un coton imbibé de toxique), la mort survient en quelques jours.

De même, en injectant aux Lapins des doses élevées de benzène (plusieurs centimètres cubes par jour), C. G. SANTESSON [177] vit apparaître un état de somnolence, de l'hypothermie, des troubles de l'équilibre, symptômes rapidement suivis de la mort des animaux.

J. P. LANGLOIS et G. DESBOUIS [120], en 1907, soumirent des animaux de laboratoire à l'inhalation prolongée de benzol. Ils notèrent, chez le Lapin, le Cobaye et le Pigeon, une augmentation du nombre des hématies, mais les résultats de ces auteurs ont été infirmés par la suite.

Un progrès sensible dans la connaissance du mécanisme de l'intoxication benzénique fut réalisé grâce aux travaux de

L. SELLING [186]. Par injection sous-cutanée de benzène à des Lapins, il put obtenir expérimentalement, après une phase d'excitation passagère, la leucopénie qu'il avait mise en évidence cliniquement.

Il montra que, parmi les globules blancs, ce sont les petits lymphocytes qui semblent les plus résistants au poison, les polynucléaires étant beaucoup plus sensibles sont atteints les premiers.

Il mit en évidence une aplasie complète des tissus générateurs des éléments figurés du sang, l'atteinte de la moëlle osseuse étant plus accentuée que celle des organes lymphatiques.

A. PAPPENHEIM [164] émit l'hypothèse que les leucocytes disparaissent du sang périphérique, partie par empêchement de leur formation au niveau de la moëlle osseuse, partie par accumulation dans les capillaires des organes tels que le foie, le poumon, la rate... Il n'y aurait pas, pour cet auteur, destruction des éléments sanguins, mais déplacement de ceux-ci de la périphérie vers la profondeur.

Mais cette hypothèse, admise par I. SOHN [194], fut rejetée par la grande majorité des auteurs et, en particulier, par L. LAUNOY et M. LÉVY-BRUHL [121] qui montrèrent que la leucopénie, observée dans l'intoxication benzénique, était une leucopénie vraie due à la destruction des globules blancs.

H. G. WEISKOTTEN et ses collaborateurs [207] [208], opérant, suivant la technique de SELLING, sur des Lapins normaux ou splénectomisés, ont trouvé que, d'une manière presque constante, la baisse leucocytaire se faisait en deux temps : la prophase, chute initiale suivie d'un relèvement notable, puis la deutérophase, nouvelle chute suivie d'une remontée définitive à la normale. C'est ce qu'ils nomment la « leucopénie diphasique », sans avoir pu, jusqu'à présent, établir la cause de ce phénomène. Ces chutes sont accompagnées d'une diminution marquée du nombre des polymorphonucléaires.

En 1929, N. M. NIKOLAJEW et L. A. SCHPARO [157] reprirent l'étude du mécanisme de l'action du benzène sur les organes sanguiformateurs. Ils réalisèrent, sur des Lapins et sur des Cobayes, des intoxications chroniques par injection sous-cutanée

de solutions huileuses, en évitant les doses fortes employées par L. SELLING [186] et A. PAPPENHEIM [164], de façon à pouvoir prolonger l'intoxication pendant plus d'un mois.

Ils é mirent une hypothèse au moins ingénieuse. Le benzène ne s'attaquerait pas aux leucocytes, mais seulement aux hématies qui subiraient l'érythrophagie du système réticulo-endothélial, ceci expliquerait les dépôts pigmentaires constatés par certains auteurs et, en particulier, par W. NEUMANN [156]. Le taux des hématies du sang circulant variant très peu au cours de l'intoxication, celles-ci sont donc régénérées. Pour les auteurs, les cellules du système réticulo-endothélial donnent des proérythroblastes à partir des produits de dégradation des hématies, évolution susceptible d'aboutir à des hématies ou à des lymphocytes. Le système réticulo-endothélial formerait, dans l'intoxication benzénique, presque uniquement des hématies et la leucopénie naîtrait de l'exagération de la fonction érythropoïétique.

G. BEYER [12], expérimentant sur le Lapin, montra qu'il existait au début de l'intoxication une leucocytose passagère. Plusieurs auteurs ont, du reste, indiqué que si le benzène à doses relativement fortes provoquait la leucopénie, à doses faibles il déterminait la leucocytose.

En 1932, G. O. E. LIGNAC [141] réalisa, chez la Souris, des tableaux de leucémie et, s'appuyant sur trois observations de P. DELORÉ et J. BORGAMANO [40], de H. S. MARTLAND [146] et de P. Émile WEIL [204], chez des ouvriers respirant des vapeurs de benzène, conclut que ce toxique agissant longtemps à très faibles doses pouvait provoquer la leucémie.

R. TELEKY [197], en 1933, contesta le bien-fondé de l'interprétation que donne G. O. E. LIGNAC [141] des cas cliniques observés. Aucune indication des quantités inhalées n'avait été donnée par les cliniciens et celles-ci devaient être élevées, car elles avaient provoqué, dans l'atelier où se situe le cas de P. DELORÉ et J. BORGAMANO [40], un épistaxis abondant chez un ouvrier et, dans un autre cas, une intoxication benzénique chronique mortelle. Quant aux doses administrées par G. O. E.

LIGNAC [141] on ne peut les qualifier de doses faibles étant donné l'animal auquel elles s'adressaient et le fait que, suffisamment répétées, elles finissaient par produire des phénomènes d'intoxication aiguë plus ou moins prononcés.

Pour D. TELEKY [197], les cas de leucémie apparus sont dus à une prédisposition individuelle.

Si l'action sur les leucocytes et sur les organes sanguiformateurs doit être mise au premier plan de l'intoxication benzénique, il ne faut pas oublier diverses actions également intéressantes.

L. SELLING [185] avait, dès 1910, signalé, dans l'intoxication benzénique, une diminution du taux des plaquettes sanguines ou thrombocytes.

W. W. DUKE [45], en 1913, puis H. G. WEISKOTTEN et ses collaborateurs [209] obtinrent, chez le Lapin, une thrombopénie manifeste par intoxication benzénique.

S. H. HURWITZ et C. K. DRINKER [102], en 1915, trouvèrent des résultats comparables et notèrent que la diminution de la prothrombine dans le sang expliquait le retard à la coagulation et les hémorragies observées dans les intoxications benzéniques.

G. FONTANA [69], en 1922, devait retrouver la thrombopénie chez les Cobayes.

F. SARTORIUS et M. SUDHUES [178], en 1933, ne trouvèrent pas de modifications importantes du nombre des plaquettes par l'intoxication prolongée de Lapins avec des doses faibles de benzène.

Toutefois l'existence d'une thrombopénie benzénique ne doit pas être mise en doute et, en 1933, au cours d'une étude statistique M. M. NIKULINA et A. N. TITOWA [159] signalent une diminution appréciable du taux des plaquettes sanguines chez 90 p. 100 des ouvriers travaillant dans des ateliers où l'on manipule le benzène.

Cette modification apparaît avant la leucopénie, mais ne suit pas une courbe parallèle.

Le benzène, lésant les tissus et les cellules spécialisées dans la défense de l'organisme contre les infections, il doit s'ensuivre un affaiblissement de la résistance de l'individu se traduisant, en particulier, par une diminution des anticorps spécifiques.

Ces faits ont été vérifiés expérimentalement.

W. E. CAMP et E. A. BAUMGARTNER [25], réalisant des réactions inflammatoires sur des Lapins intoxiqués, constatèrent qu'il n'y avait pas d'afflux leucocytaire au point lésé comme cela a lieu chez l'animal normal.

J. P. SIMMONDS et H. M. JONES [188], en 1915, utilisant comme antigène, d'une part, les hématies de Mouton et, d'autre part, les Bacilles typhiques, trouvèrent, chez les Lapins benzénisés, une diminution des anticorps. De même, G. Y. RUSK, [174] trouva une diminution des hémolysines, précipitines et agglutinines pour les globules de Mouton, accompagnant des lésions typiques de la moëlle osseuse.

Après de nombreuses expériences, L. HEKTOEN [96] conclut que le benzène pouvait diminuer la résistance aux infections de trois manières au moins : par diminution de la production des anticorps, par réduction du nombre des leucocytes et par affaiblissement de leur activité phagocytaire.

F. SARTORIUS et M. SUDHUES [178], en 1933, puis E. LEMÉTAYER, en 1934, par administration de petites doses de benzène, les premiers au Lapin, le second au Cheval, obtinrent une augmentation de la production d'anticorps. Cependant, dans l'intoxication benzénique habituellement observée, intoxication avec leucopénie, on trouve une diminution de la production d'anticorps avec moindre résistance des individus aux infections. M. C. WINTERNITZ et A. D. HIRSCHFELDER [212] notèrent ce fait pour la pneumonie expérimentale et W. C. WHITE et A. M. GAMMON [210] pour la tuberculose. Pour M. LÉVY-BRUHL [138], si l'action leucotoxique et les lésions graves des centres leucopoïétiques sont pour une part dans cette diminution de résistance, les graves lésions viscérales produites par le benzène entrent certainement en ligne de compte.

Prophylaxie de l'intoxication benzénique industrielle.

Nous laisserons de côté, au cours de ce travail, le point de vue purement clinique, renvoyant pour la bibliographie aux travaux

récents de C. P. MAC CORD [145], en Amérique, et Z. OVARY [161], en France, mais nous tenons à dire quelques mots de la prophylaxie de l'intoxication benzénique.

Si des doses très faibles, respirées pendant un temps suffisamment long, peuvent être la cause d'intoxications chroniques, la prédisposition individuelle joue également un grand rôle, ce qui rend le problème de la prophylaxie particulièrement complexe.

On ne peut songer à interdire l'emploi du benzène ou du benzol et à les remplacer par d'autres solvants moins dangereux, tel le toluène, dont le prix de revient est beaucoup plus élevé et le débit commercial restreint.

Il faut donc prendre des dispositions susceptibles de protéger les ouvriers de l'atteinte du benzène.

Diverses précautions sont à envisager :

1° La diminution de la quantité de benzène inhalée par l'ouvrier peut être obtenue par une ventilation appropriée des ateliers, en tenant compte de la densité élevée des vapeurs de benzène, et par une réduction de la durée du travail.

Dans certains cas, les ouvriers pourront être munis de masques, mais ce mode de protection ne peut être que temporaire. Dans d'autres cas, pour la peinture au pistolet, par exemple, l'ouvrier pourra être protégé par une cage de verre ventilée l'isolant de l'atmosphère toxique.

2° La sélection des ouvriers et l'élimination des sujets prédisposés à l'intoxication sont des précautions importantes. Parmi les facteurs prédisposants à l'intoxication benzénique, il convient de signaler : l'âge, les jeunes étant moins résistants, et le sexe, les femmes, plus particulièrement les femmes enceintes, étant plus sensibles au benzénisme. De plus, pour la femme, les risques d'hémorragies sont plus grands. Il existe également des facteurs morbides : cardiopathie, affections de l'appareil respiratoire, tendance aux hémorragies, alcoolisme, qui prédisposent à l'intoxication, ainsi que certains facteurs sociaux : fatigue, dénutrition, etc...

3° De fréquents examens des ouvriers permettront le dépistage de l'intoxication. L'ouvrier travaillant dans une atmosphère renfermant des vapeurs de benzène devra être suivi périodiquement, tant au point de vue hématologique, qu'au point de vue de l'état général. L'intoxication est souvent signalée par des maux de tête, de l'inappétence, de la fatigue, de la gastralgie, de petites hémorragies nasales et gingivales ; c'est la période de prébenzénisme, bien décrite par F. HEIM DE BALSAC [93]. A ce moment, le dépistage de l'intoxication peut se faire avec fruit.

Le « National Safety Council » considère comme le meilleur test de benzénisme, une diminution du taux des leucocytes de 25 p. 100, par rapport à la normale, fixée, en moyenne, à 7.500.

4° Les travailleurs seront instruits du danger qui les menace et des mesures de prophylaxie facilement réalisables seront prescrites : douches, changements de vêtements après le travail, etc... Les mains seront protégées du contact du benzène par des gants ou par une couche d'huile ou de glycérine.

INTOXICATIONS THÉRAPEUTIQUES.

Nous n'avons volontairement considéré jusqu'ici que les intoxications industrielles et les travaux qu'elles ont suscités. C'est qu'en effet, elles tiennent la première place, laissant loin derrière elles les intoxications accidentelles ou d'ordre thérapeutique.

L'odeur pénétrante du benzène, sa saveur brûlante, mettent en garde ceux qui pourraient l'ingérer par erreur, de plus, sa toxicité *per os* est relativement minime, en raison de sa faible solubilité dans les liquides aqueux qui s'oppose à son absorption au niveau des muqueuses stomacale et intestinale. En outre, il provoque des vomissements qui l'éliminent en grande partie.

Les symptômes observés, après ingestion d'une forte dose (30 g. environ) de benzène, consistent en brûlures d'estomac, vomissements, dysphagie, faiblesse, pâleur avec refroidissement des extrémités et affaiblissement du pouls. La mort survient par défaillance cardiaque.

L'usage thérapeutique du benzène est relativement ancien et, dès 1848, SIMPSON préconisait son emploi comme anesthésique, mais rapidement on l'abandonna en raison de son action convulsivante.

Mais sa principale utilisation thérapeutique date des travaux de L. SELLING [186] et de la connaissance de son action leucolytique. A.V. KORANYI [117] et son élève G. KIRALYFI [113] le préconisèrent dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique, principalement dans les cas rebelles aux rayons X. Pour obtenir un résultat, il faut employer des doses assez fortes et prolonger le traitement.

Son administration se fait par voie buccale, à la dose journalière de 3 à 4 g., en capsules gélatinées, chaque capsule renfermant 0 g., 50 de benzène mélangé à son poids d'huile d'olive. S'il est mal toléré *per os*, on peut l'administrer par voie rectale : 80 à 100 gouttes dans 20 g. d'huile d'arachide. L'action se fait sentir après une ou deux semaines. Après une faible augmentation passagère, le taux des leucocytes, prodigieusement élevé (parfois plusieurs centaines de mille par mm^3), diminue lentement d'abord, puis rapidement, tandis que l'anémie régresse.

L'action du médicament doit être suivie, à cette période, par des examens de sang quotidiens et le traitement supprimé totalement lorsque le taux leucocytaire atteint 20.000. On surveille également les urines afin de déceler l'albumine ou l'hématurie.

Malgré les accidents bénins (purpura, hémorragies légères) ou graves plusieurs fois observés, ce traitement longtemps discuté a maintenant acquis droit de cité. En règle générale, le benzène bien manié donne, dans les états leucémiques, des résultats satisfaisants : baisse progressive du nombre des leucocytes qui revient au voisinage de la normale, amélioration de l'état général, régression des principaux symptômes physiques et fonctionnels.

On a également préconisé l'emploi du benzène, dans les mêmes conditions que précédemment, pour diminuer la réaction leucocytaire dans l'ostéomyélite aiguë.

Le benzène entre dans quelques préparations pour l'usage externe. Il est utilisé en pommades pour le traitement de la gale ou la destruction du *Phthirus pubis*. Enfin, grâce à ses propriétés dissolvantes, il sert à préparer certains emplâtres.

De l'usage thérapeutique du benzène, ce qu'il faut surtout retenir c'est qu'une indication clinique a été basée sur le principal symptôme de l'intoxication chronique : la leucopénie.

Ceci indique la surveillance attentive que nécessitera son emploi, dans les cas de leucémie, si l'on ne veut pas dépasser le but recherché et voir apparaître les symptômes typiques du benzénisme.

Mais, si nous avons mentionné des accidents apparus lors du traitement, ils sont relativement rares et, dans les statistiques d'intoxication benzénique, ils n'occupent qu'une très petite place à côté des intoxications industrielles, malheureusement encore fréquentes.

* * *

DEUXIÈME PARTIE

IDENTIFICATION ET DOSAGE DU BENZÈNE EN TOXICOLOGIE

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUES DE DOSAGE DU BENZÈNE APPLICABLES A LA TOXICOLOGIE

Un des buts que nous nous étions assigné, pour notre thèse, était la recherche de la localisation du benzène dans les tissus d'animaux intoxiqués, la répartition élective de ce toxique dans certains organes pouvant nous permettre de comprendre le mécanisme des intoxications. Il nous fallait donc avoir, à notre disposition, une technique de dosage applicable en toxicologie.

Les diverses méthodes proposées reposent :

- soit sur les propriétés physiques,
- soit sur les propriétés chimiques du benzène.

Nous étudierons donc successivement, les propriétés physiques et chimiques du benzène et les techniques qui en découlent pour le dosage de ce toxique dans l'atmosphère ou dans les viscères.

I. — Dosage du benzène dans l'atmosphère.

A. — MÉTHODES BASÉES SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSIQUES DU BENZÈNE

Les propriétés physiques du benzène, permettant un dosage de ce composé, ne sont, d'une manière générale, nullement spécifiques. Seule la spectrographie ultra-violette permet d'identifier facilement et sûrement le benzène, ainsi que l'ont montré W.H. FULWEILER et J. BARNES [76], puis S.A. SCHOU [181], mais aucune application quantitative n'en avait été faite jusqu'alors.

Par contre, un certain nombre de techniques de dosage du benzène ont été proposées, reposant, les unes et les autres, sur des propriétés communes à tous les homologues du benzène et, parfois même, à d'autres composés.

Nous allons reprendre, l'une après l'autre, ces diverses méthodes et en résumer rapidement les principes.

I. — CONDENSATION DU BENZÈNE A BASSE TEMPÉRATURE.

L'atmosphère est préalablement privée d'anhydride carbonique et de vapeur d'eau et le benzène est condensé à basse température. Le dosage s'effectue alors :

— soit par pesée du produit condensé, ainsi que l'a proposé H. SAINTE-CLAIRE DEVILLE [175], pour le dosage du benzène dans le gaz d'éclairage ;

— soit par mesure de la pression partielle, dans le vide, du benzène condensé, selon la méthode de G.A. BURREL, F.M. SIBERT et I.W. ROBERTSON [23].

Ces méthodes ne sont nullement spécifiques, car toutes les vapeurs, facilement condensables, se comporteraient comme le benzène.

II. — DISSOLUTION DU BENZÈNE.

Le gaz, séché sur du chlorure de calcium, est absorbé par l'huile de paraffine contenue dans un barboteur refroidi à -20° . De l'augmentation de poids, on déduit la quantité de benzène dissoute.

A partir d'une atmosphère donnée, K.B. LEHMANN [133], par cette méthode, retrouve 100 p. 100 du benzène existant.

III. — ADSORPTION DU BENZÈNE.

Les vapeurs de benzène sont adsorbées par passage sur des substances à grande surface de contact (charbon actif ou gel de silice).

L'augmentation du poids de ces substances permet le dosage.

La méthode au charbon actif a été préconisée, en toxicologie, par le comité du benzol au « National Safety Council » de 1926. L. GREENBURG [80] en a précisé la technique qui, simple et rapide, permet, par la simple différence de poids du charbon activé, de retrouver 92 p. 100 du benzène présent dans l'atmosphère.

La méthode au gel de silice étudiée, en 1926, dans le rapport « Spray Painting in Pennsylvania » est décrite par C. P. MAC CORD [145] dans son ouvrage. Le courant d'air à analyser, préalablement desséché, passe à la surface du gel qui fixe les vapeurs de benzène. Par chauffage, pendant 5 heures, à $150-160^{\circ}$, sous pression réduite, le gel abandonne le solvant, dont les vapeurs sont ensuite condensées à -20° , dans un récipient spécial, préalablement taré, dont l'augmentation de poids indique la quantité de benzène de l'échantillon.

IV. — RAPPORT DE LA VISCOSITÉ AU POIDS SPÉCIFIQUE.

BIBEL [13] a proposé son appareil pour l'évaluation automatique du benzol dans l'air.

La méthode est basée sur la détermination du rapport de la viscosité au poids spécifique, la viscosité étant mesurée par la

résistance qu'éprouve le gaz à traverser un tube capillaire et, le poids spécifique, par la vitesse de passage à travers un orifice étroit.

Il faut un minimum de 200 mg. de benzène par litre pour que celui-ci soit décelé par cet appareil.

V. — RÉFRACTOMÉTRIE - INTERFÉROMÉTRIE.

La réfractométrie est basée sur la variation de l'indice de réfraction de l'atmosphère en présence de benzène. On ne mesure jamais directement l'indice de réfraction d'un gaz, mais la différence de cet indice avec celui d'un gaz connu. On déterminera donc ici, après déshydratation et élimination de l'anhydride carbonique, d'une part, l'indice de réfraction de l'atmosphère renfermant le toxique et d'autre part, celui de cette même atmosphère privée de benzène, par passage sur du charbon activé, par exemple.

L'indice de réfraction peut être déterminé par l'interféromètre de Rayleigh Zeiss.

Cette méthode très rapide, pouvant s'effectuer avec un appareil portatif, est très utilisée aux Etats-Unis pour vérifier la non toxicité d'une atmosphère. Elle est décrite en détails au « Bureau of Mines technical paper 185 ».

Elle a été également utilisée, en Allemagne, par W. E. ENGELHARDT [52], au cours de recherches expérimentales, et par E. BREZINA et W. SCHMIDT [20], pour l'étude de l'efficacité de la ventilation de locaux industriels où l'on employait le benzène.

Ce procédé n'est malheureusement pas spécifique et n'est valable que dans des conditions strictement définies (analyse préalable du solvant utilisé, recherche qualitative du toxique dans l'atmosphère).

Cette absence de spécificité est le défaut essentiel de toutes les méthodes physiques proposées pour le dosage du benzène dans une atmosphère.

B. — MÉTHODES BASÉES SUR LES PROPRIÉTÉS CHIMIQUES DU BENZÈNE

La propriété qu'ont les carbures aromatiques de donner naissance à des dérivés nitrés, est la base de plusieurs méthodes de dosage du benzène. Certaines techniques sont basées sur d'autres propriétés chimiques : oxydation, formation d'un dérivé hexabromé insoluble, absorption par le cyanure de nickel. Ces dernières, beaucoup moins importantes, ne seront que rapidement signalées.

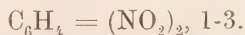
I. — NITRATION DU BENZÈNE.

L'acide nitrique fumant réagit, à froid, sur les carbures aromatiques pour donner naissance, avec élimination d'eau, à un dérivé mononitré. Le remplacement de l'atome d'hydrogène par le reste monovalent NO_2 se fait dans le noyau et l'on obtient, avec le benzène, le nitrobenzène.



La réaction ne va pas plus loin, mais si l'on élève la température ou si l'on opère à froid en présence d'acide sulfurique, on obtient des dérivés dinitrés et même trinitrés, suivant la composition du mélange acide et la température à laquelle on opère.

C'est ainsi que, si l'on opère à l'ébullition ou si l'on fait intervenir un mélange d'acide nitrique fumant et d'acide sulfurique concentré, on obtient le métadinitrobenzène



Il se forme simultanément, mais en petites quantités, l'ortho-dinitrobenzène et le paradinitrobenzène, ces deux corps étant d'autant moins rares que la réaction a été opérée à température plus haute.

Ces dinitrobenzènes donnent des réactions colorées caractéristiques qui permettent de les identifier.

Les principales sont les suivantes :

a) **Réaction de CHAVASSIEU et MOREL [33].**

Le dinitrobenzène, en solution alcoolique, donne, avec de la lessive de soude et une solution de lévulose à 1 p. 100, une coloration violette caractéristique, permettant de déceler quelques milligrammes du produit.

La plupart des auteurs attribuaient cette réaction au méta-dinitrobenzène. A. MOREL et R. MARTHOUD [154] montrèrent qu'elle devait être due au dérivé ortho qui se forme, en faible quantité, lors de la nitration.

L. VON SZECSENYI-NAGY [195] l'affirme également et R. TRUHAUT [199], dans un récent mémoire, se trouve d'accord avec ces auteurs pour attribuer à l'orthodinitrobenzène la coloration violette produite avec le lévulose, en milieu alcoolique et alcalin.

b) **Réaction de J. V. JANOVSKY [105].**

Le métadinitrobenzène, en milieu alcoolique alcalin, donne avec l'acétone une coloration violacée typique.

c) **Réaction de HALPHEN [85].**

Le dinitrobenzène est réduit par l'hydrogène naissant en l'amine correspondante. Par diazotation et copulation avec l' α -naphтол, on obtient une coloration rouge orangé intense. Cette réaction, très sensible, permet de déceler le dinitrobenzène à la dilution de un cent millième. Elle est moins spécifique que les précédentes, les homologues du benzène donnant des colorations voisines difficilement différenciables.

Les méthodes de dosage que nous allons examiner, reposent, les unes sur le fait que le dinitrobenzène est un corps cristallisé, les autres sur les réactions colorées ci-dessus énumérées.

1° **Pesée du dinitrobenzène formé.**

E. HARBECK et G. LUNGE [90], en 1896, montrent, les premiers, qu'il est possible de fixer quantitativement le benzène d'une atmosphère par un mélange d'acide sulfurique concentré

et d'acide nitrique fumant. Le benzène est, dans ces conditions, transformé en dinitrobenzène qu'on isole et qu'on pèse.

A. CHASSAVANT [30], en 1905, propose une méthode de dosage ne différant de la précédente que par quelques points de détails.

K. B. LEHMANN [133], en 1910, par ce procédé de pesée du dérivé dinitré, obtient un rendement de 95 p. 100. Le mélange acide renfermant le dinitrobenzène est dilué et neutralisé par la soude. Le dinitrobenzène, extrait à l'éther, est pesé après évaporation du solvant.

2° Réduction des groupements nitrés.

A) Méthodes volumétriques.

Le dinitrobenzène isolé est réduit, en milieu acide, par une quantité connue de solution titrée de chlorure stanneux, selon la réaction :



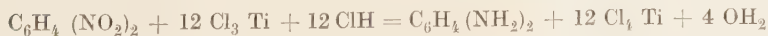
L'excès du réactif est dosé par un oxydant, tel que l'iode, qui le transforme en sel au maximum.

C'est la base d'une méthode due à O. PFEIFFER [171], modifiée et appliquée à la toxicologie par B. S. ELLIOT et M. C. DALTON [51], en 1919.

Cette méthode serait sensible au milligramme et applicable en présence d'alcool, d'acétone, d'éther aliphatique. Mais elle a donné aux auteurs qui l'ont essayée des résultats inconstants.

L'année suivante D. FLORENTIN et H. VANDENBERGHE [67] étudiant cette réaction, en vue du dosage rapide des dérivés nitrés des explosifs, préconisent le remplacement du chlorure stanneux, peu stable, par le chlorure titaneux, dont l'excès est aisément déterminé à l'aide d'un sel ferrique en présence de sulfocyanure comme indicateur.

Les réactions sont les suivantes :



F. L. ENGLISH [54], à la même époque, préconise également cette modification et effectue la réduction à l'abri de l'air, dans un courant d'anhydride carbonique.

H. F. SMYTH et H. F. SMYTH jr. [192], en 1928, effectuant en Amérique une enquête sanitaire dans les usines utilisant le benzol comme solvant, reprennent l'étude de la méthode de B. S. ELLIOT et M. C. DALTON [51].

Opérant sur des atmosphères de composition connue, ils retrouvent 92 p. 100 du benzène mis en œuvre.

Cette méthode permet de doser, avec exactitude, le benzène, en l'absence de ses homologues supérieurs, pour des teneurs de l'ordre de 0 mg., 3 par litre d'air.

Pour des quantités plus fortes (60 mg. par litre), la fixation dans le barboteur est incomplète, d'où une importante erreur par défaut.

H. F. SMYTH jr. [193], en 1929, reprend l'étude de cette réaction, en vue d'augmenter sa précision, sa sensibilité et d'étudier la possibilité d'un dosage du benzène en présence de toluène.

Au cours des essais effectués, sur le benzène pur, pour l'établissement de sa méthode de dosage, SMYTH trouvait parfois d'énormes erreurs par défaut, en rapport avec de faibles variations de l'alcalinité de la solution soumise à l'entraînement par la vapeur d'eau. Cette constatation fut à la base de la modification empirique proposée par l'auteur pour l'élimination du toluène.

Après barbotage de l'atmosphère, le mélange nitrant est chauffé 30 minutes au bain-marie pour achever la nitration, puis, après dilution et neutralisation exacte, la solution est fortement alcalinisée. La séparation du dérivé nitré est précédée d'un chauffage à reflux durant 15 minutes, on fait alors arriver le courant de vapeur d'eau et le dosage est continué comme il est indiqué plus haut. Dans ces conditions d'alcalinité, le dinitrobenzène n'est pas altéré tandis que le dérivé nitré du toluène est détruit. On doit utiliser cette modification du mode opératoire si l'on soupçonne la présence de toluène dans l'échantillon. Grâce à elle, le benzène peut être dosé avec une

erreur par défaut inférieure à 15 p. 100, en présence de 3 parties de toluène.

Lorsqu'il y a 8 fois plus de toluène que de benzène, on a une importante erreur par excès, car la distillation en solution tampon n'élimine pas entièrement l'interférence due au toluène.

Cette méthode sensible et précise est considérée jusqu'à présent, en Amérique, comme la plus satisfaisante, mais elle est délicate, longue et nécessite un appareillage relativement compliqué.

B) Méthodes colorimétriques.

La réduction est effectuée par l'hydrogène naissant et l'amine obtenue est la base d'une matière colorante.

a) Méthode de I. D. GADASKIN, 1928 [77].

L'amine formée est condensée avec la diméthylphénylènediamine. L'oxydation ménagée conduit au violet neutre.

b) Méthode de A. A. GAVRILOV, 1931 [78].

La solution acide renfermant l'amine formée est neutralisée par le carbonate de sodium, puis acidifiée de nouveau par l'acide tartrique. Sous l'action de l'hypochlorite de chaux, on obtient une coloration rose violacé stable, qu'on compare aux colorations fournies, dans les mêmes conditions, par des quantités connues de benzène. La précision est de l'ordre de 3 p. 100 environ.

3° Dosages basés sur les réactions colorées du dinitrobenzène.

a) Méthode de M. PÉRONNET et R. TRUHAUT, 1933 [170].

Ces auteurs utilisent la coloration violette produite, avec le lévulose, par le dinitrobenzène, en milieu alcoolique et alcalin.

L'atmosphère passe dans un mélange à parties égales d'acide sulfurique et d'acide nitrique fumant qui donne, en une heure, à la température du mélange réfrigérant (glace + chlorure de sodium), une transformation sensiblement quantitative du carbure en dinitrobenzène, à condition que la quantité de

mélange nitrant soit au moins 10 fois supérieure à la quantité de benzène à fixer.

Les conditions optima, déterminées par les auteurs, pour le développement d'une coloration suffisamment stable sont les suivantes :

alcalinité en soude : N/8 ;

degré alcoolique de la solution : 65° à 75° ;

température de 25°, maintenue pendant 15 à 20 minutes.

Dans ces conditions, il y a proportionnalité entre la matière colorante formée et la quantité de dinitrobenzène présente.

La méthode permet de doser le benzène avec une erreur maximum de 2,5 p. 100, pour des quantités comprises entre 10 et 60 mg. Le volume d'atmosphère à prélever sera donc variable et dépendra de sa teneur en benzène.

Le dosage n'est pas troublé par la présence de vapeurs d'alcool, d'éther, d'acétone, de chloroforme, de tétrachlorure ou de sulfure de carbone. Il n'est pas applicable en présence de toluène et de xylène qui donnent, à la nitration, des dérivés qui, par alcalinisation, fournissent respectivement des teintes bleu roi et vert bleu qui décèlent leur présence.

b) Méthode de L. VON SZECSENYI-NAGY, 1935 [196].

Elle est basée sur la réaction de J.V. JANOVSKY [105], la suppression de l'alcool rendant la coloration stable.

La nitration s'effectue au moyen d'un mélange de deux parties d'acide nitrique fumant, pour une d'acide sulfurique concentré.

Après dilution et neutralisation par la soude on extrait le métadinitrobenzène par l'éther, qu'on évapore ensuite. Le résidu est repris par l'acétone, on alcalinise avec la soude à 33 p. 100 et on évalue, après 30 minutes, la coloration violette obtenue, au spectrophotomètre de Pulfrich.

La coloration reste stable pendant 3 heures.

c) Méthode de H. H. SCHRENK, S. J. PEARCE et W. P. YANT, 1935 [182].

Ces auteurs proposent, pour le dosage de très faibles

quantités de benzène, un procédé basé sur l'évaluation de l'intensité de la coloration pourpre donnée par le métadinitrobenzène en présence de butanone et de soude.

On peut, par cette méthode, doser 0 mg., 001 de benzène, l'erreur restant inférieure à 5 p. 100, pour des quantités variant de 0 mg., 01 à 0 mg., 06.

Le toluène et l'éthylbenzène fournissent, dans les mêmes conditions, une coloration identique mais moins intense.

La méthode n'est donc pas applicable en leur présence.

II. — COMBUSTION DU BENZÈNE.

La méthode de S. P. MATWEJEV, Y. B. PRONIN et O. Y. FROST [147] a été appliquée au benzène par N. W. LAZAREW et ses collaborateurs [128].

L'air renfermant le benzène, privé de son anhydride carbonique, passe sur un fil de platine porté au rouge. Le benzène brûle aux dépens de l'oxygène de l'air analysé, en donnant $\text{CO}_2 + \text{OH}_2$.

Les gaz formés rencontrent une solution très diluée de soude, de titre convenable, tombant goutte à goutte à une vitesse constante. Tout l'anhydride carbonique de la combustion est fixé par cette soude à l'état de carbonate.

Les gouttes tombent dans un récipient parcouru par un courant électrique de faible intensité. La conductibilité du carbonate de sodium étant, à concentration moléculaire égale, deux fois moindre que celle de la soude, l'intensité du courant diminue. Le dosage lui-même consiste à noter, à intervalles déterminés, 30 secondes à une minute, les données du milliampermètre.

Une formule établie par les auteurs indique directement la concentration du benzène, en milligrammes par litre.

Cette méthode est applicable à de nombreux composés organiques volatils, carbures d'hydrogène, éther, acétone etc.. Par contre, elle n'est spécifique d'aucun d'eux et elle nécessite l'identification préalable du benzène dans l'atmosphère et l'absence d'autres substances donnant de l'anhydride carbonique par combustion. Elle présente néanmoins un certain intérêt pour les recherches expérimentales, en raison de sa grande

sensibilité (0 mg., 1 à 0 mg.,01 dans la prise d'essai), de sa précision suffisante (± 5 p. 100) et surtout de son fonctionnement continu. Elle a été utilisée pour suivre, chez l'animal, l'élimination du toxique en fonction du temps.

Du procédé de dosage par combustion dérive également un appareil automatique de détection du benzène, le « Burrel methane indicator » [108]. Les hydrocarbures d'un échantillon d'atmosphère sont comburés et l'on mesure la contraction de volume produite, celle-ci étant proportionnelle à la quantité de benzène. Ce dispositif a été utilisé, en Amérique, dans certaines usines. Il n'est pas valable pour la détermination de faibles concentrations.

III. — OXYDATION DU BENZÈNE.

W. A. COOK et J. B. FICKLEN [35] condensent le benzène de l'atmosphère dans un barboteur refroidi par le mélange neige carbonique et acétone, puis l'oxydent par l'eau oxygénée en présence de sulfate ferreux.

Avec 5 mg. de benzène il se produit une coloration brune caractéristique et avec 10 mg., un précipité noir amorphe. Par addition d'une solution d'acide nitrique, le précipité se dissout en donnant une solution colorée qui, diluée avec de l'eau, peut être comparée avec des standards.

De nombreux solvants empêchent cette réaction ou la gênent, et cela d'autant plus que leur solubilité dans l'eau est plus grande.

D'après les auteurs, cette méthode permet l'estimation du benzène dans les limites de l'investigation industrielle.

IV — FORMATION DU DÉRIVÉ HEXABROMÉ.

F. SCHULTZ [184] transforme le benzène, sous l'action du bromure d'aluminium anhydre, en dérivé hexabromé insoluble. En pesant ce dérivé, on peut doser ainsi quelques milligrammes de benzène dans l'air. Cette méthode non spécifique n'a pas d'intérêt toxicologique aussi ne la détaillerons nous pas.

V. — ABSORPTION DU BENZÈNE PAR LE CYANURE DE NICKEL AMMONIACAL.

L. N. DENNIS et E. S. MAC CARTHY [41] ont proposé une méthode basée sur cette propriété mais ce procédé n'est pas spécifique et ne peut être appliqué à une étude toxicologique.

Si peu de méthodes permettent d'apprécier, en toute certitude, la quantité de benzène existant dans une atmosphère, un certain nombre d'entre elles devront encore être écartées lorsqu'il s'agira de les appliquer au dosage dans le sang et les organes.

*
* *

2. — Dosage du benzène dans le sang et les organes

Les méthodes utilisées sont, le plus souvent, la simple application au benzène, séparé préalablement du sang et des organes, des techniques précédemment décrites. Tous les auteurs isolent donc, dans un premier temps, le benzène du sang ou des tissus. Seule I. D. GADASKIN [77] effectue la nitration directement sur le sang.

Méthode dérivée de la réaction de HALPHEN, utilisée par I. D. GADASKIN [77].

Le dinitrobenzène, formé par nitration directe du sang contenant le benzène, est extrait par l'éther, isolé et réduit au bain-marie bouillant par le chlorure stanneux chlorhydrique. Après alcalinisation, la paraphénylènediamine formée est extraite à l'éther, puis condensée, après élimination de l'éther, avec la diméthylphénylènediamine. On oxyde enfin par l'eau oxygénée à douce chaleur. Il se forme du violet neutre en quantité proportionnelle au benzène mis en jeu. Un coton trempé dans cette solution prend une coloration dont l'intensité permet l'évaluation du benzène.

La sensibilité est, d'après l'auteur, de 14 mg. par litre.

Le dosage est gêné par une coloration rosée accessoire, due à l'action de l'acide nitrique sur les protides du sérum.

Aussi tous les autres auteurs ont-ils séparé préalablement le toxique des viscères. Cette séparation peut s'effectuer :

- 1) Par distillation avec ou sans entraînement à la vapeur d'eau.
- 2) Par entraînement du benzène par barbotage d'un courant d'air dans le sang.
- 3) Par combinaison de ces deux procédés : distillation suivie d'entraînement par l'air du benzène du distillat.

I. — MÉTHODES PAR DISTILLATION :

Dans presque toutes les méthodes utilisant la distillation, le dosage est terminé par transformation du benzène en son dérivé dinitré.

Cette opération devant s'effectuer par action d'acides concentrés, ne peut se faire directement sur le distillat. Une seconde opération est nécessaire pour isoler de ce distillat aqueux, par un solvant organique, les faibles quantités de benzène qui s'y trouvent dissoutes. Ce solvant ne doit pas être attaquant par le mélange sulfonitrique puisque la nitration se fera en sa présence.

Méthode de G. JOACHIMOGLU [107].

La première technique proposée, la seule utilisée d'ailleurs jusqu'à ces dernières années, est due à G. JOACHIMOGLU [107]. Ayant essayé plusieurs solvants, pour l'extraction du benzène du distillat, cet auteur a adopté finalement le tétrachlorure de carbone qui lui a donné les meilleurs résultats.

L'auteur ne retrouve que 55 à 60 p. 100 du benzène ajouté à des bouillies d'organes. Il attribue ce fait aux pertes qui auraient lieu pendant la distillation et surtout au cours du traitement du distillat par le tétrachlorure de carbone. Celui-ci, n'entraînerait pas tout le benzène, réparti suivant son coefficient de partage entre les deux liquides. Cette méthode fut utilisée par A. O. GETTLER [79] qui accélère la distillation par entraînement à la vapeur d'eau et épuise le distillat par agitation, à plusieurs reprises, avec le tétrachlorure de carbone. G. F. KOPPENHÖFER [116] retrouve, dans ces conditions, 80 à 85 p. 100 du benzène ajouté par lui aux organes. On peut se demander ce que deviendrait ce pourcentage, si, au lieu d'opérer sur des mélanges synthétiques : organes + benzène, on effectuait le dosage dans les viscères d'animaux intoxiqués, la fixation du benzène étant très différente dans les deux cas et beaucoup plus intime dans le second.

J. PELTZER [167] emploie cette même méthode, mais caractérise et dose le benzène colorimétriquement, par la réaction de

J. V. JANOVSKY [105]. Il prétend déceler ainsi deux millièmes de milligramme.

Méthode de VON SZECSENYI-NAGY [196].

La réaction de J. V. JANOVSKY [105] est utilisée également par VON SZECSENYI-NAGY [196] qui, contrairement aux autres auteurs, nitre directement le benzène dans le distillat.

Le toxique est séparé de la bouillie viscérale, par chauffage à 90°, dans un appareil distillatoire. Le benzène passe en premier lieu, il est reçu dans le mélange nitrant refroidi. On élève ensuite la température, pour rincer l'appareil. Le mélange acide est finalement dilué, alcalinisé et traité par l'éther. Après évaporation, le résidu, constitué par du métadinitrobenzène, est repris par l'acétone et alcalinisé par la soude. La portion acétonique, colorée en violet, est décantée, puis examinée au photomètre, préalablement étalonné, à l'aide d'une solution titrée de dinitrobenzène.

La réaction est très sensible et permet de déceler 0 mg., 066 de benzène dans 100 cm³. Par contre, le rendement d'extraction n'est que de 70 p. 100, par rapport à la quantité théorique.

Enfin S. I. PEARCE, H. H. SCHRENK et W. P. YANT [166] appliquent pour le sang et les organes, après distillation, la méthode qu'ils ont décrite pour le dosage du benzène dans l'air.

II. — ENTRAINEMENT DU BENZÈNE DU SANG, PAR UN COURANT D'AIR.

Le benzène, entraîné par un courant d'air lent qui barbote dans le sang, peut être dosé suivant les diverses méthodes décrites précédemment pour le dosage du benzène dans une atmosphère.

Ce procédé n'est pas utilisable directement pour les viscères.

Méthode de N. W. LAZAREW [128].

Elle dérive de la méthode de S. P. MATWEJEW, Y. B. PRONIN et O. Y. FROST [147] déjà décrite.

Quelques centimètres cubes de sang, recueillis sur du citrate ou de l'oxalate de sodium, sont introduits immédiatement dans un barboteur taré, muni de deux rodages, renfermant du coton de verre qui arrêtera la mousse produite. On réunit le barboteur à l'appareil à combustion, par l'intermédiaire d'un second barboteur à chaux sodée, chargé de fixer l'anhydride carbonique de l'atmosphère extérieure et du sang. On fait alors passer le courant d'air qui entraîne le benzène. Celui-ci sera brûlé en donnant $\text{CO}_2 + \text{OH}_2$. L'anhydride carbonique formé sera évalué grâce aux variations de la conductibilité électrique qu'il provoquera en se combinant à une solution de soude.

Méthode de M. PÉRONNET [168].

Cet auteur applique, au dosage du benzène dans le sang et les organes, la méthode qu'il a décrite, en collaboration avec R. TRUHAUT [170]. Il réduit au dixième la quantité de mélange sulfonitrique employé, ainsi que celle de tous les autres réactifs, et peut doser des quantités de benzène inférieures au milligramme.

Un courant d'air passe à travers le sang légèrement chauffé et entraîne le benzène que l'on dose.

Une prise de sang de 25 à 50 g. est placée dans un barboteur de Durand de 250 cm³, dont le tube adducteur est muni, à sa partie inférieure, d'une boule percée de trous, très voisine du fond du récipient. Le flacon étant plongé dans l'eau à 40°, on y fait passer un courant d'air lent (3 litres à l'heure), produit par un vase de Mariotte en circuit fermé. Ce volume d'air suffit, dans ces conditions, pour entraîner tout le benzène contenu dans l'échantillon. La mousse produite est retenue par un tube en U garni de coton de verre. Le benzène est transformé en dérivé dinitré, par barbotage dans le mélange nitrant refroidi. La suite des opérations s'effectue comme nous l'avons vu précédemment. On compare la coloration produite, soit à un témoin constitué par de l'eau contenant du benzène et traité dans les mêmes conditions, soit à un témoin artificiel stable constitué par le mélange dans des proportions déterminées de perchlorure de fer, sulfate de cuivre et acide salicylique.

L'intensité de la coloration violette produite est proportionnelle aux doses de chlorure ferrique et de sulfate cuivrique mises en œuvre. L'auteur déclare doser, par cette méthode, 0 mg., 2 à 5 mg. de benzène extrait de 50 cm³ de sang, avec une erreur maxima de 5 p. 100 par défaut. Un dixième de milligramme est encore décelable, mais la coloration est trop faible pour permettre un dosage colorimétrique rigoureux. La méthode n'est pas applicable en présence des homologues du benzène.

W.P. YANT, H.H. PEARCE et P.H. MAUTZ [215] opèrent de la façon suivante : les organes finement pulpés, placés dans un ballon, sont additionnés de deux fois leur poids d'eau sulfurique à 0,50 p. 100. Un courant d'azote barbote, pendant deux heures, dans le liquide chauffé et entraîne le benzène qui est fixé ensuite par le mélange sulfonitrique. Le dinitrobenzène formé est dosé suivant la méthode de H.F. SMYTH jr. [193].

III. — DISTILLATION SUIVIE D'ENTRAÎNEMENT PAR L'AIR DU BENZÈNE DU DISTILLAT.

Ce mode d'extraction combine les deux procédés : distillation et entraînement par l'air. M. PÉRONNET [168] l'emploie pour le dosage du benzène dans les viscères, mais ne l'a essayé que sur des mélanges artificiels de benzène et d'organes.

Avant d'entreprendre l'étude toxicologique du benzène, il nous fallait avoir une méthode sûre, précise et sensible nous permettant de doser cette substance, d'une part, dans l'atmosphère, d'autre part, dans le sang et les viscères. Nous avons donc entrepris l'étude comparative des méthodes proposées. Nous avons éliminé d'emblée celles qui n'étaient pas spécifiques, ce qui nous a limité à l'étude des méthodes chimiques basées sur la transformation du benzène en son dérivé dinitré.

La pesée du dinitrobenzène formé, nécessitant une identification secondaire du produit, a été abandonnée par tous les auteurs.

La méthode de H. F. SMYTH jr. [193] n'est exacte que pour des conditions rigoureuses de pH, elle est donc sujette à des

erreurs, comme d'ailleurs les techniques colorimétriques après réduction, par exemple celle de GADASKIN.

Nous n'avons donc retenu que les méthodes utilisant une des réactions colorées données par le dinitrobenzène avec certains aldéhydes, cétones ou oses en milieu alcalin, et, parmi celles-ci, nous avons étudié tout particulièrement la technique de M. PÉRONNET et R. TRUHAUT [170] quoique, pour l'application à l'étude des intoxications industrielles, elle présente l'inconvénient de n'être plus utilisable en présence des homologues du benzène.

Appliquée au dosage du benzène dans des atmosphères de concentration connue, elle nous a donné des résultats d'une précision satisfaisante. C'est ainsi que sur un prélèvement correspondant à 19 mg., 1 de benzène, nous en avons retrouvé 18 mg., 7 et, pour 22 mg. : 21 mg., 4, soit des erreurs par défaut de 2 et 2,7 p. 100.

Nous avons essayé également, pour le dosage du benzène dans le sang, la technique indiquée par M. PÉRONNET [168], qui n'est d'ailleurs qu'une application de la méthode précédente, rendue plus sensible par une modification dans la proportion des réactifs.

Nous avons été arrêté ici par une difficulté technique. Alors que l'auteur obtient une extraction complète du benzène du sang, par passage, dans ce sang chauffé à 40°, de 3 litres d'air en une heure, nous n'avons pu obtenir un résultat comparable. L'appareil que nous avons utilisé correspondait, à quelques détails près, à celui décrit par l'auteur. Nous avons remplacé par des rodages, les joints de caoutchouc et adopté pour le barbotage, au lieu du tube à boule, le dispositif proposé par M. PÉRONNET [168]. Avec le débit indiqué par l'auteur, l'air ne passe dans l'appareil que bulle à bulle et le sang, brassé d'une façon insuffisante, conserve son benzène. C'est ainsi qu'il nous a fallu trois passages successifs de 3 litres d'air, dans un échantillon, pour en extraire le benzène.

Nous avons ajouté 6 mg., 72 de benzène, en solution alcoolique, à 50 g. de sang. Par trois extractions successives nous avons obtenu 4 mg., 3, 1 mg., 36 et 0 mg., 73, soit au total 6 mg., 39, le 4^e essai s'est révélé négatif.

Nous n'avons pu améliorer ce rendement, qui, pour un mélange extemporané, est nettement insuffisant. La vitesse du courant gazeux est limitée par les dimensions restreintes du barboteur renfermant seulement 0 cm³, 36 de réactif nitrant. Si le courant gazeux est plus rapide, la fixation risque d'être incomplète.

Ne pouvant utiliser cette méthode, dans les conditions indiquées par l'auteur, nous l'avons abandonnée.

Il nous fallait donc mettre au point une technique de dosage.

*
* * *

CHAPITRE II

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE SPECTROGRAPHIQUE DE DOSAGE DU BENZÈNE DANS L'ATMOSPHÈRE, LE SANG ET LES ORGANES

Les méthodes physiques, proposées par les divers auteurs, pour le dosage du benzène, qu'elles soient basées sur l'adsorption au moyen de charbon actif ou de gel de silice, ou sur la réfractométrie, n'offrent aucune spécificité.

Par contre, la réaction de caractérisation par spectrographie ultra-violette, indiquée par W. H. FULWEILLER et J. BARNES [76] et par S. A. SCHOU [181], nous a paru d'un grand intérêt toxicologique, en raison de sa sensibilité et de sa spécificité.

Nous avons pensé qu'il serait possible de mettre au point, à partir de cette réaction, une méthode de dosage.

Nous en avons donc entrepris l'étude et avons rendu cette réaction quantitative, grâce à un dispositif pratique récemment réalisé par R. FABRE et L. AMY [59], pour la mesure de l'absorption dans l'ultra-violet.

Le benzène, le toluène et les xylènes possèdent un spectre d'absorption dans l'ultra-violet qui permet leur identification.

L'œil étant insensible à cette région du spectre, les mesures d'absorption ne peuvent se faire directement au spectrophotomètre comme on peut le faire pour la lumière visible. Par contre, les bandes d'absorption peuvent être mises en évidence par la photographie. Pour étudier l'absorption ultra-violette d'un composé déterminé en solution, on forme l'image de son spectre sur une plaque photographique et l'on obtient, après développement, un cliché présentant un noircissement variable avec les différentes longueurs d'onde considérées, ce qui permet de connaître les zones d'absorption dans l'ultra-violet.

L'étude du spectre d'absorption dans l'ultra-violet de la vapeur de benzène, déjà effectuée par de nombreux auteurs, dans le but d'élucider sa structure spaciaie, a été reprise, en 1922, par V. HENRI [98].

La vapeur de benzène était placée dans le vide, sous des pressions variables, et la source lumineuse était une étincelle à haute fréquence éclatant dans l'eau entre deux électrodes d'aluminium. L'auteur a montré l'existence de 350 raies très fines et rapprochées, leurs intensités étant entre elles dans le rapport de 1 à 6.500.

Le spectre d'absorption ultra-violette du benzène liquide ou de ses solutions dans divers solvants organiques a été étudié également par V. HENRI [98]. Ce spectre dérive du spectre de vapeur par fusion, avec élargissement des bandes et, de plus, léger décalage vers le rouge. Il est formé de deux groupes de bandes : le premier, constitué par huit bandes situées entre 2.690 et 2.290 U.Å., le second, par trois bandes dans l'ultra-violet extrême.

Ces bandes sont asymétriques du côté des grandes longueurs d'onde, où elles présentent un épaulement. Leurs positions varient légèrement avec le solvant.

Nous avons préféré au spectre de vapeur, le spectre d'absorption du benzène en solution, dont l'intérêt toxicologique nous a paru plus élevé. Ces solutions peuvent être, en effet, facilement obtenues à partir d'atmosphères et même d'organes. Elles sont de manipulation facile et peuvent être conservées longtemps sans modification.

Nous avons effectué nos recherches sur des solutions de benzène dans l'alcool pur pour spectrographie et nous avons utilisé, plus spécialement, les bandes B.C.D.E. du spectre étudié par V. HENRI [98].

La mesure de l'absorption d'une radiation consiste à comparer deux intensités lumineuses : l'intensité incidente I_0 et celle du faisceau transmis après passage à travers la substance absorbante : I_d . Par définition la densité optique est donnée par la formule : $d = \log. 10 \frac{I_0}{I_d}$, c'est le logarithme du rapport de ces deux densités.

La densité optique est proportionnelle à l'épaisseur l du liquide traversé par le rayon lumineux, à sa concentration c en composé absorbant et à un coefficient d'absorption ε , ne dépendant, pour une longueur d'onde déterminée, que de la nature du composé examiné.

$$\text{On a : } d = l \cdot c \cdot \varepsilon$$

Il n'est pas possible de déduire directement du noircissement de la plaque en chaque point du spectre, l'intensité du rayonnement qui l'a impressionnée, de nombreuses causes extérieures influençant le noircissement (longueur d'onde, temps d'exposition, température, état hygrométrique de l'air, conditions du développement, nature de l'émulsion).

Le cliché permet seulement d'établir si les quantités d'énergie lumineuse l'ayant impressionné sont ou ne sont pas égales. On s'efforcera donc de réaliser l'égalité de noircissement, entre le flux lumineux ayant traversé la cuve d'absorption et le flux incident atténué dans un rapport connu, soit par modification du temps de pose, ce qui est compliqué et peu sûr, soit par un dispositif approprié.

Divers moyens ont été proposés pour réaliser l'affaiblissement du flux : diaphragmes, coins étalonnés, polariseurs, secteurs tournants. R. FABRE et L. AMY [59], après avoir passé en revue et critiqué ces divers procédés, proposent un dispositif d'absorption utilisant la réflexion vitreuse. C'est cette méthode que nous utiliserons.

Le dispositif expérimental dont nous nous sommes servi comprend :

- 1° Une source lumineuse ultra-violette (S).
- 2° Deux cuves, l'une (A) contenant la solution à étudier, l'autre (B) renfermant l'alcool témoin.
- 3° Un spectrographe (C).
- 4° Un appareil producteur d'étincelles de haute fréquence.
- 5° Le¹ dispositif d'absorption (D) dû à R. FABRE et L. AMY [59].

1° Source lumineuse.

La source lumineuse (S) est une lampe à hydrogène de Chalonge et Lambley, modèle Dunoyer, fonctionnant sous une tension pouvant varier de 1.500 à 2.000 volts. Elle est montée sur le secondaire d'un transformateur (T), dont le primaire est alimenté par le secteur. Le régime de la lampe peut varier entre des limites assez étendues ; l'intensité du courant est réglée au moyen d'un rhéostat (R).

L'absorption devant porter sur la région ultra-violetle du spectre comprise entre 2.700 et 2.200 U.Å., région pour laquelle le spectre est parfaitement continu, la lampe à hydrogène est fermée par une fenêtre en quartz, transparente à ce rayonnement.

Une circulation d'eau refroidit le tube intérieur, siège de la décharge lumineuse, et permet de prolonger le temps de pose, sans crainte d'élévation de température.

2° Cuves.

Les solutions sont placées dans les cuves de Jobin (A) et (B), à faces parallèles, limitées par des lames de quartz, laissant entre elles un intervalle pouvant varier de 0 mm., 01 à 20 mm.

3° Spectrographe.

On utilise le grand spectrographe de Féry fournissant un spectre de 215 mm. de longueur, qui s'étend du visible à 2.200 U.Å. dans l'ultra-violet. La fente (F) est réglable à l'aide d'un tambour (G), gradué en $1/200^e$ de millimètre. Le châssis (H), porteur de la plaque, mobile verticalement, permet d'effectuer, sur un même cliché, onze spectres successifs de 2 mm. de hauteur.

Le faisceau lumineux traverse la cuve renfermant la solution à étudier et arrive sur une petite lentille (L) cylindro-sphérique, qui donne, sur la fente du spectrographe, une image linéaire de la source. Cette lentille est fixée sur une glissière qui coulisse dans la direction même du prisme et permet une mise au point exacte.

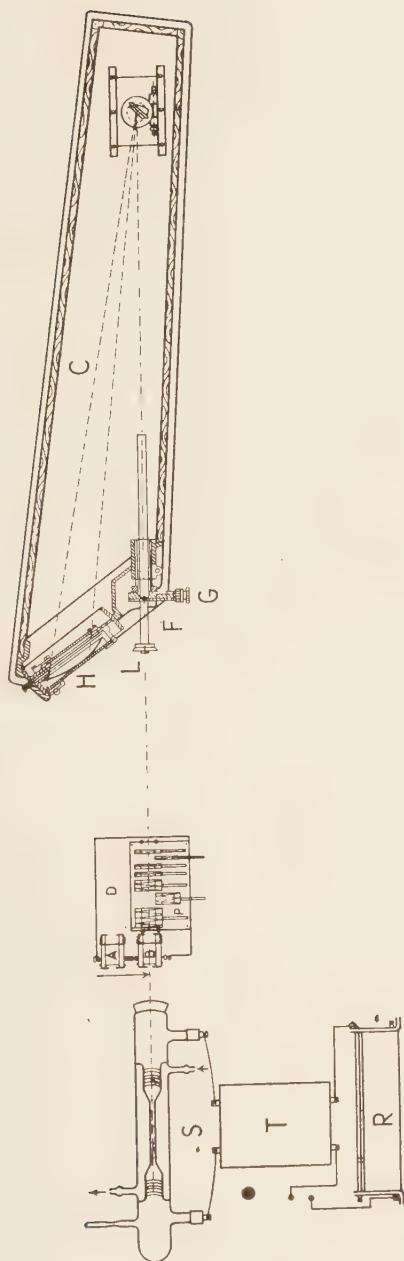


FIG. I. — Dispositif utilisé pour le dosage spectrographique du benzène

- | | | | |
|--------|---|---|------------------------------|
| A et B | Cuves de Jobin. | H | Châssis porte-plaque. |
| C | Spectrographe de Féry. | L | Lentille cylindro-sphérique. |
| D | Dispositif d'absorption de
R. Fabre et L. Amy. | P | Pile de lames de quartz. |
| F | Fente du spectrographe. | R | Rhéostat. |
| G | Tambour gradué. | S | Lampe à vapeurs d'hydrogène |
| | | T | Transformateur. |

4° Appareil producteur d'étincelles de haute fréquence pour l'obtention des raies d'émission du fer.

Ce spectre du fer complète les clichés et permet le repérage des longueurs d'onde, à 1 U.Å. près, dans la région 2.300 U.Å. et, à 4 ou 5 U.Å. près, dans la région 4.000 U.Å.

5° Dispositif d'absorption de R. FABRE et L. AMY [59].

Il comporte une pile de lames de quartz inclinées par rapport à l'axe de la pile et les unes par rapport aux autres, sans qu'il y ait aucun couple de lames parallèles. Le rayonnement lumineux qui les rencontre s'atténue de la fraction constante qui, s'y réfléchissant, est éliminée.

Le dispositif est constitué par une pile (P) de 25 lames de quartz de 0 mm., 5 d'épaisseur, protégées de la poussière par un carter, dont les faces d'entrée et de sortie sont munies de 2 lames de quartz supplémentaires, ce qui porte leur nombre à 27. Ces lames sont disposées, isolément ou par groupes, sur des glissières de telle sorte qu'on peut en placer un nombre quelconque sur le trajet du faisceau lumineux. L'ensemble est monté sur un plateau mobile permettant de placer devant le faisceau incident, soit la solution en expérience, soit le solvant pur et les lames.

On utilise la technique des spectres imbriqués, consistant à alterner, sur la même plaque photographique, les spectres à étudier et les spectres du solvant pur, plus ou moins affaiblis par l'interposition d'un nombre de lames variable.

Pour les points où il y a égalité entre les deux systèmes de spectre, la densité optique du corps dissous correspond à celle de la pile de lames de quartz. Cette densité varie légèrement avec la longueur d'onde, la correction est facilement établie.

M. le Professeur TASSILLY, a mis aimablement à notre disposition le spectrographe de FÉRY au laboratoire de physique de la Faculté de Pharmacie ; qu'il trouve ici l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

Par la suite, nos recherches ont été poursuivies dans les laboratoires de contrôle de l'Académie de Médecine dirigés par M. le Professeur René FABRE.

Les plaques utilisées étaient des plaques au gélatinobromure d'argent Lumière, à sensibilité extrême et à grand contraste. Nous avons dû leur substituer, en raison des dimensions du châssis de notre second spectrographe, les plaques Ancra anti halo Guilleminot.

La mise en place des clichés et leur développement s'effectuent dans l'obscurité absolue ; le réactif utilisé pour le développement est ainsi composé :

Métol.....	5 g.
Hydroquinone.....	8 g.
Bromure de potassium.....	1 g.
Sulfite de sodium cristallisé.....	50 g.
Carbonate de potassium.....	35 g.
Eau distillée q. s. p.....	1000 g.

Le révélateur, conservé à l'abri de la lumière est employé dilué au 1/2, pour accentuer les contrastes.

Après lavage, le fixage se fait également à l'obscurité, trente minutes, dans la solution suivante :

Hyposulfite de sodium cristallisé.....	250 g.
Sol. bisulfite de sodium.....	25 cm ³
Eau q. s. p.....	1000 g.

Après lavage pendant deux heures à l'eau courante les plaques sont mises à égoutter verticalement.

ÉTUDE QUALITATIVE.

Muni de ce matériel d'étude, nous avons recherché sur des solutions alcooliques de benzène, établies en volume, les conditions optima pour l'obtention du spectre d'absorption du benzène. Pour ce faire, nous avons étudié successivement l'influence des différentes variables :

concentration en benzène des solutions examinées sous épaisseur constante de 20 mm. ;

intensité du courant ;

fente du spectrographe ;

temps de pose.

Le spectre de la solution benzénique est encadré d'un spectre de comparaison fourni par le solvant seul (alcool à 95%) et d'un spectre de référence (raies d'émission du fer) réalisé avec une fente de 0 mm., 015 et un temps de pose de 5 secondes.

Nous avons choisi, pour les spectres d'absorption, les caractéristiques indiquées dans le tableau N° 1.

TABLEAU N° 1

Caractéristiques choisies pour les spectres d'absorption

	PLAQUES	
	LUMIÈRE	ANECRA
Intensité du courant en milliampères sous 2000 volts.....	230	100
Fente en millimètres.	0,2	0,2
Temps de pose.....	1 minute	1 minute

Dans ces conditions, les clichés présentent, avec une solution de benzène à 0,50 pour 1.000, quatre bandes d'absorption particulièrement nettes, dont les maxima correspondent aux chiffres classiques : 2.607, 2.540, 2.482, 2.430 U.Å..

En étudiant le spectre d'absorption, à des dilutions de plus en plus grandes de benzène dans l'alcool, on voit ce spectre s'atténuer et disparaître, à l'examen direct, pour des dilutions atteignant 1/20.000. Cependant, on peut encore, à l'aide du microphotomètre enregistreur [176], déceler la présence de quatre bandes et déterminer leurs maxima d'absorption, pour des dilutions atteignant 1/100.000. Cet examen, sous 20 mm. d'épaisseur, nécessitant seulement 10 cm³ de solution benzénique à 1/100.000, il suffit donc d'avoir, dans la prise d'essai, 0 mg., 1 de benzène pour l'identifier.

Cette méthode convient pour l'étude qualitative des dilutions alcooliques de benzène comprises entre 1/2.000 et 1/100.000.

Pour des solutions plus concentrées, les bandes s'étalent et se fusionnent et il est impossible de mesurer, avec précision, la position des maxima. Il suffit alors de diluer avec de l'alcool à 95° dans des proportions connues.

ETUDE QUANTITATIVE.

Pour l'étude quantitative, nous traçons la courbe d'absorption obtenue, en portant en abscisses les longueurs d'onde et en ordonnées les densités optiques.

Ces densités optiques sont déduites du nombre de lames qu'il est nécessaire d'interposer devant la solution témoin, pour obtenir l'égalité de noircissement avec la solution à titrer. Ce nombre de lames variera selon la longueur d'onde, l'absorption étant plus ou moins intense suivant celle-ci.

Au lieu de rechercher systématiquement, pour une longueur d'onde déterminée, à réaliser l'égalité de noircissement, par interposition d'un nombre variable de lames, il est plus simple de rechercher d'abord les zones d'égal noircissement, c'est-à-dire, de même densité optique, et de noter les longueurs d'onde correspondantes. On obtient ainsi un certain nombre de points.

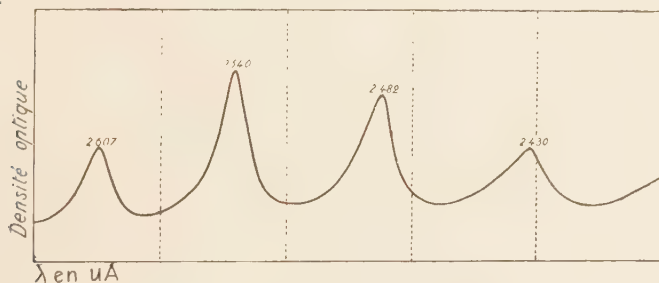


FIG. 2. — Courbe d'absorption dans l'ultra-violet du benzène en solution alcoolique.

Ils suffisent à tracer la courbe complètement, sauf dans les régions présentant un maximum ou un minimum. Ceux-ci se trouvent, en général, entre deux valeurs des spectres témoins; cependant, si les densités de ces deux témoins sont

suffisamment rapprochées, on peut interpoler et obtenir la valeur exacte de l'intensité de rayonnement pour les points intermédiaires.

Nos plaques photographiques nous permettant d'obtenir onze clichés sur une même plaque, nous comparions, au cours des essais préliminaires, notre solution avec le témoin affaibli par un nombre de lames croissant de quatre en quatre. Dans un second essai, nous précisions les points intermédiaires.

Lorsque la mesure s'effectue à une lame près, la précision, pour les densités optiques les plus élevées, est de $1/27$, soit environ 5 p. 100.

Il convient de noter que, pour obtenir un cliché interprétable, les temps de pose doivent varier avec le nombre de lames interposées. On trouvera dans le tableau N° II, les temps que nous avons adoptés dans nos expériences.

La comparaison quantitative des noircissements obtenus sur la plaque photographique peut se faire soit directement à l'œil, soit au microphotomètre. Mais, dans ce dernier cas, en raison des irrégularités dues à la source lumineuse et au développement de la plaque, la précision obtenue n'est pas très supérieure à celle de la méthode visuelle. Avec quelque pratique, en effet, un expérimentateur peut évaluer, à l'œil, les égalités de noircissement avec une approximation suffisante.

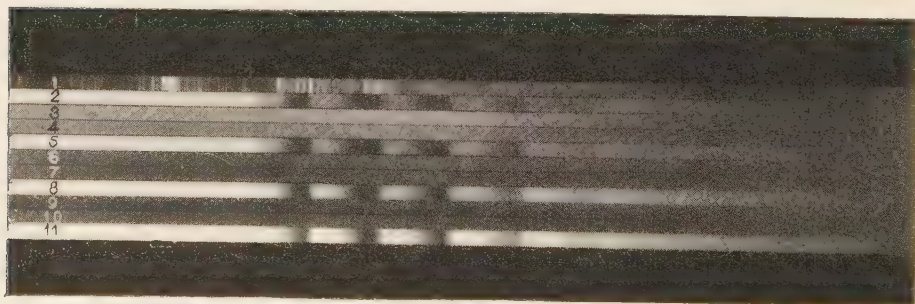


FIG. 3. — Spectrogrammes d'une solution alcoolique de benzène à 0,50 p. 1.000 sous 20 mm. comparés à ceux de l'alcool pur.
Technique des spectres imbriqués.

(Les numéros des spectrogrammes correspondent à ceux du tableau N° II)

TABLEAU N^o II

Technique des spectres imbriqués.

Variations du temps de pose, suivant le nombre de lames interposées.

	TEMPS DE POSE
1. Spectre de référence du fer	10 sec.
2. Solution	1 min.
3. Témoin + 7 lames	
4. Témoin + 11 lames	1 min. 30 sec.
5. Solution	
6. Témoin + 15 lames	
7. Témoin + 19 lames	3 min.
8. Solution	
9. Témoin + 23 lames	
10. Témoin + 27 lames	10 min.
11. Solution	

Avant d'appliquer cette technique au dosage du benzène, nous avons recherché si ce corps, en solution alcoolique, suit la loi de Lambert-Beer, c'est-à-dire si, sous une épaisseur donnée, la densité optique est proportionnelle à la concentration. On sait que la densité optique est toujours proportionnelle à l'épaisseur.

Nous avons fait une série de spectres en faisant varier la concentration et l'épaisseur, de telle façon que leur produit reste constant. La concentration a varié de 0,001 à 0,020 et l'épaisseur de 20 à 1 mm. Aux erreurs d'expérience près, les spectres sont identiques dans tous les cas.

La loi de Lambert-Beer est donc applicable et la densité optique proportionnelle à la teneur en benzène.

Il suffit donc d'étalonner l'appareil, une fois pour toutes, par rapport à une solution alcoolique de benzène de titre connu.

Pour une solution de 0,45 p. 1.000, sous 20 mm. d'épaisseur, on a, pour les maxima des quatres bandes indiquées, les valeurs de densité suivantes :

TABLEAU N° III

Densités optiques correspondant aux maxima des bandes d'absorption du benzène, en solution alcoolique à 0,45 p. 1.000, sous 20 mm.

LONGUEURS D'ONDE en U.Å.	NOMBRE DE LAMES DE QUARTZ POUR RÉALISER L'ÉGALITÉ DE NOIRCISSEMENT	DENSITÉS OPTIQUES
2.607.....	21	1,28
2.540.....	26	1,59
2.482.....	23	1,41
2.430.....	12	0,74

La précision est d'autant plus grande que la densité à mesurer est plus élevée, celle-ci ne dépassant pas évidemment certaines limites.

L'appareil que nous avons utilisé ne permet pas de dépasser 1,7. Avec une concentration en benzène de 0,45 p. 1.000, sous 20 mm., les densités optiques de trois des maxima se trouvent aux environs de 1,5. On peut obtenir alors, en une seule opération et avec une bonne précision, les densités correspondant aux quatres bandes. Ces valeurs permettent de calculer la teneur en benzène de la solution.

Si l'on ne dispose pas d'un appareil affaiblissant le rayonnement d'une manière connue, on peut se contenter d'encadrer le spectrogramme de la solution à doser, de ceux de solutions alcooliques de titre connu en benzène. La technique consistera alors à chercher la concentration du témoin pour laquelle on observe, aux mêmes longueurs d'onde, une égalité de noircissement avec la solution à doser.

La précision de ce dosage atteint 5 p. 100. Il est indispensable, comme nous venons de le voir, d'opérer dans les limites de concentrations assez étroites : entre 0,25 et 0,50 p. 1.000, sous 20 mm.. Pour des concentrations plus fortes, les bandes d'absorption ne sont plus nettes ; à de plus grandes dilutions, la précision diminue en raison de l'accroissement des causes d'erreur.

Ce dosage s'effectue sur 10 cm³. Il permet d'évaluer des quantités de benzène de l'ordre de 2 à 5 mg...

On pourrait obtenir une plus grande sensibilité, en augmentant la longueur de la cuve aux dépens de son diamètre, afin d'opérer, pour un même volume de liquide, sous une épaisseur plus grande.

Ces essais font encore ressortir l'intérêt de la technique. Il suffit de quelques centimètres cubes de solution très diluée pour tracer la courbe d'absorption et déterminer la teneur en benzène. Le cliché fournit un test permanent et la solution, ni modifiée ni altérée par le dosage, se prête aux vérifications.

Nous avons publié cette technique en 1934 [123]. Depuis, A. LUSZCZAK [143] a préconisé une méthode tout à fait comparable. Il affaiblit les spectres de comparaison par un dispositif de secteurs tournants. La sensibilité trouvée par l'auteur correspond à celle obtenue par notre méthode, elle est de l'ordre du dixième de milligramme.

Comparant les spectres d'absorption du benzène, du toluène et du xylène, A. LUSZCZAK [143] montre que certaines bandes d'absorption du toluène viennent se juxtaposer à celles du benzène. En étudiant la résultante de cette double absorption et en la comparant aux bandes spécifiques de l'un des corps, il est possible de poser une équation à deux inconnues, dont on tire la valeur du benzène et du toluène présents. On peut, de la même manière, analyser les systèmes benzène-xylène, toluène-xylène et benzène-toluène-xylène.

APPLICATION DE LA TECHNIQUE PROPOSÉE, A LA RECHERCHE ET AU DOSAGE DU BENZÈNE DANS UNE ATMOSPHÈRE

Le benzène est isolé de l'atmosphère, par condensation au moyen du froid, suivant la méthode générale d'analyse des mélanges gazeux, de P. LEBEAU et A. DAMIENS [131].

Cette méthode nous a permis de condenser, à -85° , dans un mélange neige carbonique et acétone, la totalité du benzène du prélèvement, en présence d'alcool à 95° qui le retient intégralement.

Le flacon à prélèvement (A) est un récipient de 2 litres, possédant, à sa partie inférieure, un robinet simple (a) et, à sa partie supérieure, un robinet à double voie (b). L'un des conduits

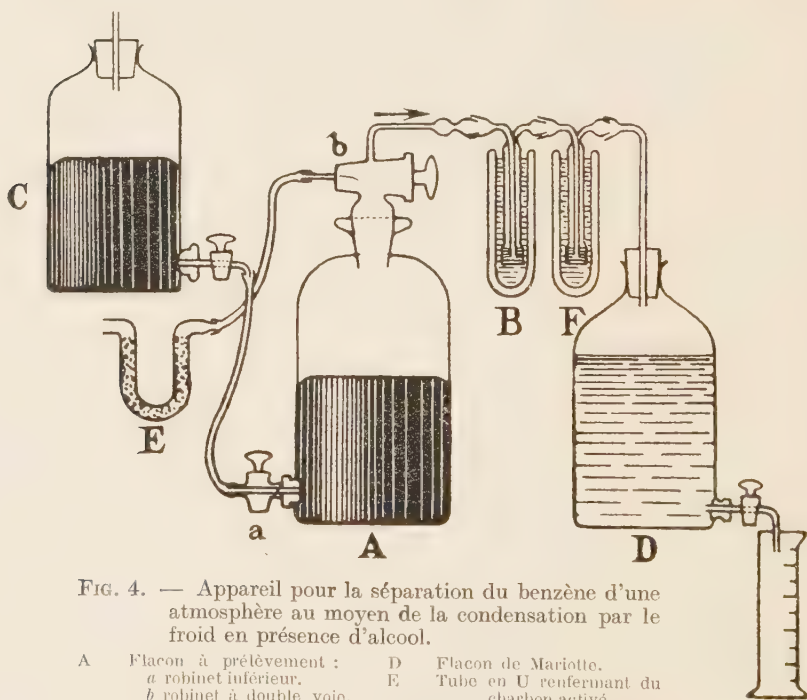


FIG. 4. — Appareil pour la séparation du benzène d'une atmosphère au moyen de la condensation par le froid en présence d'alcool.

- | | | | |
|---|---------------------------|--------|--------------------------|
| A | Flacon à prélèvement : | D | Flacon de Mariotte. |
| | a robinet inférieur. | E | Tube en U renfermant du |
| | b robinet à double voie. | | charbon activé. |
| C | Réservoir de mercure per- | B et F | Barboteurs contenant de |
| | mettant de déplacer l'at- | | l'alcool et plongés dans |
| | mosphère à analyser. | | le mélange réfrigérant. |

du robinet (b) est coudé, à angle droit et son extrémité rodée, s'adapte à un barboteur (B). Le prélèvement est fait suivant les méthodes habituelles, en atmosphère sèche.

La tubulure du flacon à prélèvement est réunie, par le rodage, au barboteur renfermant 5 cm³ d'alcool à 95° et plongé entièrement dans le mélange réfrigérant.

On fait passer l'atmosphère, bulle à bulle, dans ce barboteur, en la déplaçant à l'aide de mercure (provenant d'un réservoir C) que l'on fait arriver par le robinet inférieur du flacon. Le passage d'un litre demande environ une heure.

Quand la prise d'essai est estimée suffisante, on interrompt le passage de l'atmosphère à analyser. On procède alors à un rinçage de l'espace nuisible de l'appareil, en le mettant en communication avec l'atmosphère, par le robinet à double voie (b) et en aspirant un peu d'air par l'autre extrémité de l'appareil, à l'aide d'un flacon de Mariotte (D). Cet air, provenant de l'atmosphère extérieure, est préalablement desséché et privé, par passage sur du charbon activé (E) des traces de produits volatils qu'il pourrait contenir. L'espace nuisible étant très réduit, 50 cm³ suffisent pour le rinçage.

Le volume d'atmosphère prélevé sera connu par pesée du mercure introduit. Le contenu du barboteur est transvasé dans un flacon jaugé de 10 cm³, puis le barboteur est rincé à plusieurs reprises avec quelques centimètres cubes d'alcool à 95°. Afin d'éviter les pertes, on refroidit le flacon jaugé et l'alcool servant au rinçage. Quand ce flacon est revenu à la température ambiante, on ajuste à 10 cm³ avec de l'alcool à 95°. On agite. Sur cette solution, on procède à la recherche et, s'il y a lieu, au dosage du benzène.

Nous avons vérifié que tout le benzène du prélèvement est fixé dans le barboteur. A cet effet, nous l'avons fait suivre d'un second barboteur semblable (F), renfermant également 5 cm³ d'alcool à 95° et refroidi à — 85°. Dans cet essai, l'air prélevé renfermait 0 g., 025 de benzène. Après l'opération, le contenu des deux barboteurs a été respectivement amené à 50 cm³ (solution 1) et 20 cm³ (solution 2). Nous avons fait un cliché de

ces deux solutions. Ce cliché montre que le benzène a été fixé dans le premier barboteur. Le spectrogramme, obtenu à partir de la solution 2, ne présente aucune absorption spécifique ni à l'examen direct, ni au microphotomètre enregistreur. La solution 2 renferme moins de $1/5$ de milligramme de benzène, soit $1/125$ du prélèvement.



FIG. 5. — Spectrogrammes montrant la séparation du benzène d'une atmosphère par le froid.

- | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|
| 1 Spectre de référence du fer. | 3 Solution 1 (premier barboteur). |
| 2 Spectre témoin (alcool à 95c pur). | 4 Solution 2 (second barboteur). |

Cette technique d'isolement du benzène d'une atmosphère est donc satisfaisante.

Les résultats s'expriment généralement en milligrammes de benzène par litre d'atmosphère; cependant, les auteurs américains préfèrent les énoncer en parties de benzène par million de parties d'air ou: p. p. m.. Le facteur 313 permet d'effectuer la transformation.

Exemple: 20 mg. par litre $\times 313 = 6.260$ p. p. m..

* * *

APPLICATION DE LA MÉTHODE PROPOSÉE AU DOSAGE DU BENZÈNE DANS LES ORGANES

Nous avons pensé qu'il serait possible de rechercher le benzène, directement, par spectrographie dans les distillats d'organes d'animaux intoxiqués.

Le benzène est très peu soluble dans l'eau. Les auteurs qui le séparent des organes, par distillation, sont donc obligés, pour restreindre les risques de perte, de recueillir un volume assez important de distillat (50 cm³ environ), pour que les faibles quantités de benzène qu'il renferme puissent s'y trouver dissoutes. Toute dilution nuisant à la sensibilité de notre méthode, nous nous sommes efforcé d'obtenir tout le benzène, dans le plus faible volume possible de distillat.

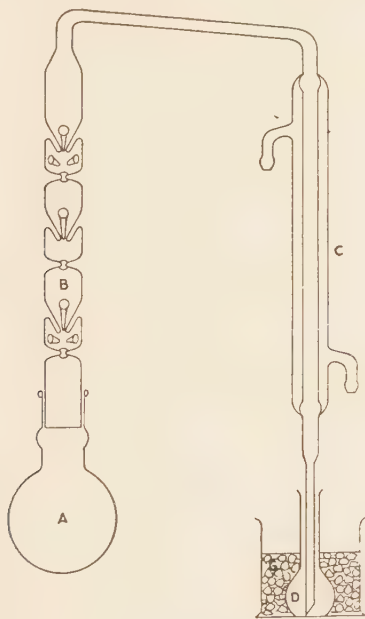


FIG. 6. — Appareil distillatoire utilisé pour les petits organes.

Nous avons, dans ce but, effectué nos distillations en présence d'alcool, dans l'espoir : 1^o d'entraîner tout le benzène dans les portions de tête ; 2^o d'obtenir ainsi des solutions alcooliques stables pouvant être spectrographiées directement.

Dans des recherches préliminaires, nous avons dû étudier le comportement, à la distillation, des mélanges ternaires : benzène, alcool et eau.

Cette étude n'a été effectuée qu'en fonction du cas particulier étudié, à savoir, le mélange de traces de benzène avec de l'alcool, en présence d'eau d'abord, puis d'organes hachés, apportant ou non le benzène.

Nous allons, en premier lieu, décrire le matériel utilisé.

Les organes à traiter s'échelonnant de l'hypophyse au foie, leur poids et leur volume sont donc très différents. Nous avons dû utiliser 2 appareils distillatoires. L'un, réservé aux petits organes, est constitué par un ballon de 100 cm³ (A) réuni, par un rodage à sec, à une colonne de Vigreux (B) de 12 cm. de longueur, continuée par un tube qui, après deux courbures à angle droit, redescend et traverse un réfrigérant (C). Le liquide condensé est recueilli, à l'extrémité de ce tube effilé, terminé en biseau, dans un petit flacon jaugé (D) de 10 cm³, refroidi dans le mélange glace et sel (G) et renfermant quelques gouttes d'alcool qui dilue les premières portions du distillat. Dans le cas d'organes plus volumineux, nous utilisons un appareil de Schloesing, en verre pyrex, dont le serpentín est réuni au ballon distillatoire de 750 cm³ de capacité, par un rodage à sec. Nous n'avons pas utilisé un grand appareil construit sur le modèle du petit, en raison de la trop grande fragilité qu'il aurait présentée.

Ces appareils réunissent les avantages suivants :

1^o Ils sont entièrement en verre, sans autre solution de continuité qu'un joint rodé à sec. Ils sont donc d'une étanchéité absolue.

2^o Ils permettent, soit la distillation fractionnée, soit le chauffage à reflux, la colonne de Vigreux ou la spirale

fonctionnant comme réfrigérant à air, lorsque le chauffage est réduit.

3° Ils sont faciles à nettoyer.

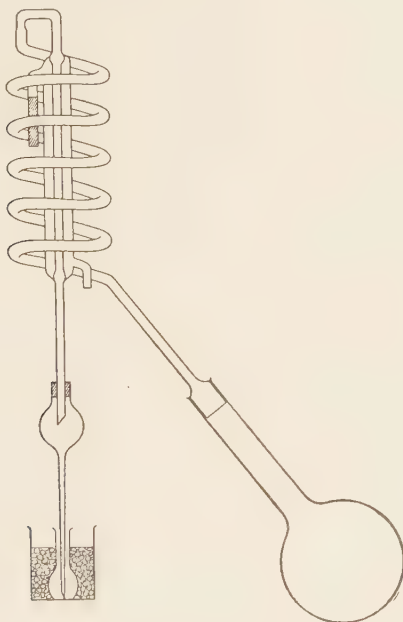


FIG. 7. — Appareil de Schloesing.

Les solutions alcooliques de benzène, utilisées pour ces essais, sont préparées en brisant une ampoule, contenant un poids connu de benzène, dans un petit ballon, renfermant de l'alcool à 95° refroidi. La solution alcoolique est transvasée dans un flacon jaugé. Le ballon et les débris de l'ampoule sont rincés, à plusieurs reprises, avec l'alcool à 95° qui sert à compléter le volume jusqu'au trait de jauge. On a ainsi une solution renfermant un poids connu de benzène dans un volume donné.

Dans le ballon distillatoire du petit appareil, on place :

Solution alcoolique de benzène à 1 p. 100..	10 cm ³
Alcool à 95°	30 cm ³
Eau distillée	30 cm ³
Acide picrique.....	0 g., 30
Une bille de verre.	

L'acide picrique empêche la mousse et sert d'agent acide et coagulant.

Le ballon est chauffé à feu doux et le distillat recueilli en quatre fractions successives de 10 cm³. Après refroidissement, le résidu est additionné à nouveau de 10 cm³ d'alcool à 95°, qui sont ensuite distillés et constituent une 5^e solution. Ces différentes solutions sont spectrographiées, sous une épaisseur de 20 mm., dans les conditions déjà indiquées.

L'absorption est complète dans l'ultra-violet pour la première fraction du distillat, en raison de sa forte teneur en benzène (environ 20 fois plus élevée que la concentration optima pour l'obtention d'une absorption sélective). Par contre, les fractions II, III, IV et V ne présentent aucune absorption et donnent un spectre identique au spectre de référence (alcool pur). Tout le benzène est donc passé dans la première fraction. Nous nous en sommes assuré en la diluant au 1/20^e, dans l'alcool à 95°. La solution ainsi obtenue présentait une courbe d'absorption ultra-violette exactement superposable à celle de la solution titrée primitive, diluée dans les mêmes proportions.

Nous avons alors, utilisant l'appareil de Schloesing, étudié le comportement, à la distillation, des solutions alcooliques de benzène, en présence d'un grand excès d'eau.

On introduit dans le ballon distillatoire :

Solution alcoolique de benzène à 1 p. 100..	10 cm ³
Alcool à 95°	10 cm ³
Eau distillée saturée d'acide picrique.....	500 cm ³

La distillation est effectuée à feu doux et le distillat recueilli en deux fractions de 10 cm³, solutions I et II. Après refroidissement, on ajoute au résidu 20 cm³ d'alcool à 95° et on recueille à nouveau, par distillation, deux fractions de 10 cm³, III et IV.

L'étude de l'absorption ultra-violette de ces solutions montre que tout le benzène distille avec la première fraction (Tableau N° IV).

Il est très probable qu'il passe avec les premières gouttes et que l'alcool distille ensuite, rinçant ainsi complètement le tube de condensation. Il est donc nécessaire de diluer immédiatement ce benzène dans quelques gouttes d'alcool, placées dans le petit ballon jaugé de 10 cm³, refroidi vers—15° dans le mélange glace et sel, conditions dans lesquelles la tension de vapeur du benzène est très faible et les risques de perte réduits au minimum.

Le volume de liquide nécessaire pour le dosage étant de 10 cm³, nous n'avons pas jugé utile de pousser plus avant cette étude en fractionnant les premiers centimètres cubes de distillat.

A la suite de ces expériences, nous avons pensé qu'il serait possible d'extraire le benzène des organes par ce procédé. Les petits organes, divisés à l'aide de ciseaux fins, dans 10 cm³ de solution saturée d'acide picrique préalablement refroidie à—15°, seraient additionnés de 10 cm³ d'alcool à 95° puis distillés. Les gros organes, hachés également dans 2 fois leur poids de solution d'acide picrique refroidie, seraient distillés, après addition de 10 cm³ d'alcool à 95°.

Dans le but d'étudier le comportement à la distillation, de quantités connues de benzène en présence d'organes, nous avons opéré sur les viscères d'animaux normaux, récemment sacrifiés : Rats, Chiens. Les organes hachés, dilués dans deux fois leur poids de solution d'acide picrique, sont additionnés de 10 cm³ de solution alcoolique titrée de benzène.

On retrouve, dans les 10 cm³ distillés, 90 p. 100 du benzène introduit, le reste, probablement fixé sur les lipoïdes des organes, n'a pu être extrait. Nous avons alors soumis la pulpe d'organe, additionnée de benzène, à une digestion préalable, dans l'appareil distillatoire même, en chauffant assez doucement pour qu'il n'y ait pas distillation. La spirale de l'appareil de Schloesing jouait, pendant le premier temps, le rôle de réfrigérant à reflux.

Nous avons maintenu cette digestion pendant des temps variables et nous avons constaté qu'après une demi-heure la

proportion de benzène extrait était comprise entre 95 et 100 p. 100.

TABLEAU N° IV

Résumé des essais effectués pour la mise au point d'une méthode d'extraction du benzène des viscères.

	TITRE alcoolique	BENZÈNE introduit, exprimé en milli- grammes	DURÉE de la digestion préalable, exprimée en minutes	BENZÈNE RETROUVÉ EN MILLIGRAMMES		Pourcentage du benzène total retrouvé
				1 ^e DISTIL- LATION	2 ^e DISTIL- LATION	
Essais effectués sur une solution titrée de benzène	55°	100	0	100	0	100
	55°	50	0	50	0	100
	4°	100	0	98	0	98
	4°	50	0	50	0	100
Essais effectués sur des organes pulvés additionnés d'une solution titrée de benzène	4°	50	0	45	0	90
	4°	10	0	9	0	90
	4°	3	0	2,6	0	87
	4°	50	15	47	0	94
	4°	50	30	50	0	100
	4°	50	60	50	0	100
	4°	100	30	100	0	100

Il restait à étudier le comportement du benzène fixé dans les tissus au cours de l'intoxication, c'est-à-dire dans les conditions mêmes où, dans la pratique, on effectuera le dosage.

La valeur de notre méthode d'extraction et de dosage ne peut être ici connue par le simple calcul du pourcentage de benzène retrouvé, puisque nous ignorons la quantité fixée par chaque organe.

Pour certains toxiques, la difficulté peut être tournée en administrant à un petit animal une quantité rigoureusement

déterminée de la substance et en faisant un dosage dans l'animal *in toto*. En raison de la grande volatilité du benzène, nous ne pouvions songer à employer ce procédé, car les sources de pertes seraient multiples, tant au cours de l'administration qu'au cours des manipulations ultérieures (élimination du toxique par la voie pulmonaire, évaporation du benzène non fixé..). Nous avons donc opéré sur des lots égaux d'un organe d'animal intoxiqué, et recherché le mode opératoire donnant le taux maximum d'extraction.

Nous avons vérifié, en outre, que par une seconde opération conduite dans des conditions analogues, sur le résidu d'organes, nous n'extrayions plus de benzène.

Nous avons intoxiqué un Chien par voie respiratoire avec du benzène à concentration suffisante pour provoquer sa mort en une heure environ.

Nous avons étudié, l'extraction du toxique sur cinq fractions du foie, nous avons constaté que, si la distillation est effectuée immédiatement, la quantité de benzène retrouvée est environ 2 fois plus faible que si la bouillie d'organes a subi préalablement une digestion d'une demi-heure par chauffage très doux, insuffisant pour provoquer la distillation. On n'obtient pas un meilleur résultat en prolongeant la digestion pendant une heure. Ce chauffage prolongé a donc une importance plus grande, lorsque le benzène a été fixé lors de l'intoxication, que s'il est ajouté à des organes normaux. Il permet à l'acide picrique de pénétrer au sein des tissus. Les albumines sont coagulées, le complexe lipido-protidique détruit et le benzène libéré.

Le résidu d'organes présentait, au sortir de l'appareil, un aspect friable et homogène tout différent de celui obtenu par distillation immédiate.

Des essais résumés dans les tableaux Nos IV et V nous pouvons conclure que :

1° En solution dans l'alcool à 4° ou à 55°, le benzène est retrouvé en totalité dans les portions de tête du distillat.

2° Ajouté à une pulpe d'organes, le benzène n'est extrait par

simple distillation en milieu alcoolique pieriqué, que dans la proportion de 90 p. 100 environ.

TABLEAU N° V

**Résumé des essais effectués pour la mise au point
d'une méthode d'extraction du benzène des viscères. Le foie,
prélevé sur un animal intoxiqué, a été divisé en cinq lots égaux.**

	TITRE de l'alcool lique	DURÉE de la digestion préalable exprimée en minutes	BENZÈNE RETROUVÉ DANS LE DISTILLAT EXPRIMÉ EN MILLIGRAMMES			
			1 ^e Distil- lation	2 ^e Distil- lation	3 ^e Distil- lation	TOTAL
1 ^{er} Lot.....	4°	0	2,5	1	0,5	4
2 ^e Lot	4°	15	4,5	1	0	5,5
3 ^e Lot	4°	30	6	0	0	6
4 ^e Lot	4°	60	6	0	0	6
5 ^e Lot	20°	30	4,5	1	0,5	6

3° Dans ces mêmes conditions, une digestion préalable de 30 minutes permet d'extraire la totalité du toxique.

4° Pour l'extraction du benzène des organes d'animaux intoxiqués, le meilleur rendement a été obtenu après une digestion préalable de 30 minutes. Il est important de recueillir dans le distillat tout l'alcool mis en œuvre, c'est pourquoi nous avons adopté l'alcool à 4° pour l'extraction du benzène des gros organes nécessitant l'emploi du Schloesing. D'autre part, l'emploi d'un alcool de titre plus élevé, conduirait, pour de nombreux viscères, à la formation de dérivés volatils pouvant interférer lors du dosage spectrographique du benzène extrait.

Nous basant sur ces données expérimentales, nous avons étudié deux cas un peu particuliers, celui du sang et celui de la graisse.

Extraction du benzène du sang.

Le benzène peut, par distillation en présence d'alcool pieriqué, être extrait du sang, mais ce dernier doit être suffisamment

dilué et le chauffage du ballon doit être effectué au bain marie pour éviter les phénomènes de collage dus à l'adhérence de la purée globulaire au fond du vase. Si l'on opère sans précautions, on a une véritable carbonisation du sang avec production de composés à pouvoir d'absorption intense, dans toute l'étendue du spectre. Ces composés, passant à la distillation, masquent complètement l'absorption due au benzène.

En observant les deux conditions que nous venons d'indiquer, le dosage du benzène peut être effectué aussi correctement dans le sang que dans les organes.

Extraction du benzène de la graisse.

Un essai d'extraction du benzène du tissu graisseux, par la technique adoptée pour les organes, nous a fourni un résultat qui nous a paru douteux étant donnée la non pénétration apparente de la graisse par la solution pieriquée et l'existence de benzène dans les distillats successifs. Nous avons donc résolu de reprendre la question. Nous avons prélevé du tissu graisseux sur un Chien ayant été en narcose benzénique pendant 5 heures.

Cet échantillon a été partagé en cinq lots égaux.

TABLEAU N° VI

Résumé des essais effectués pour la mise au point d'une méthode d'extraction du benzène du tissu graisseux. Un échantillon de graisse, prélevé sur un animal intoxiqué, a été divisé en cinq lots égaux.

	TITRE alcoo- lique	DURÉE de la digestion préalable exprimée en minutes	BENZÈNE RETROUVÉ DANS LE DISTILLAT EXPRIMÉ EN MILLIGRAMMES			
			1 ^e Portion	2 ^e Portion	3 ^e Portion	TOTAL
1 ^{er} Lot.....	4°	30	4	3	1,5	8,5
2 ^e Lot.....	40°	30	9	3	0	12
3 ^e Lot.....	95°	30	16	2	1	19
4 ^e Lot.....	95°	0	7	1,5	0,5	9
5 ^e Lot.....	95°	60	18	2,5	1	21,5

Le premier lot a été traité dans les conditions précédemment indiquées pour les organes. pour le second et le troisième nous avons substitué à l'alcool à 4°, respectivement l'alcool à 40° et à 95°.

Dans tous les cas, nos distillats étaient fractionnés par portions de 10 cm³.

Les résultats obtenus nous ont permis de conclure que l'alcool à 95° était, pour la graisse, préférable aux alcools plus faibles. Nous n'avons pas à craindre ici, la formation, par action de l'alcool fort, de dérivés pouvant gêner ultérieurement le dosage spectrographique.

Désirant examiner si, dans ce cas, la digestion préalable de 30 minutes était nécessaire et suffisante, nous avons, sur un 4° lot, fait une distillation avec l'alcool à 95°, mais sans digestion préalable. Les résultats indiquent nettement la nécessité d'une digestion. Un dernier lot a été distillé avec l'alcool à 95°, après digestion d'une heure. La graisse s'est fragmentée et a perdu sa consistance pour former au fond du ballon un dépôt homogène. Le dosage effectué nous ayant montré que ce mode opératoire nous donnait le rendement maximum, nous l'avons adopté pour l'extraction du benzène dans la graisse.

Les résultats de ces expériences sont résumés dans le tableau n° VI.

En conclusion, nous proposons la technique suivante, pour le dosage du benzène, dans le sang et dans les organes, par la méthode spectrographique.

Prélèvement des organes.

Les organes prélevés, dès la mort de l'animal, sont placés dans des bocaux tarés et bouchant bien, de capacité strictement nécessaire. On les met immédiatement en glacière et les dosages sont effectués dès que possible de manière à ce qu'ils soient terminés dans les 24 heures. Dans ces conditions les pertes sont minimales.

Matériel.

Nous conseillons l'emploi d'un des deux appareils précédemment décrits, choisi selon le poids des organes à analyser.

Il faut, en outre, avoir tout prêt, un jeu de 6 à 8 ballons jaugés de 10 cm³ et des capsules de porcelaine où les organes seront finement divisés à l'aide de ciseaux.

Les produits nécessaires sont les suivants :

- 1° alcool à 95° exempt de benzène,
- 2° solution aqueuse d'acide picrique à saturation,
- 3° mélange de glace pilée et de sel marin à parties égales.

Mode opératoire.

L'appareil distillatoire étant propre et sec, on dispose à l'orifice d'écoulement du tube de condensation ou de l'ampoule qui lui fait suite, un flacon jaugé de 10 cm³ placé dans une capsule renfermant le mélange réfrigérant : glace et sel. Dans le flacon on met environ 0 cm³,5 d'alcool, le tube d'adduction doit plonger dans cet alcool, mais ne devra jamais pénétrer trop profondément dans le distillat, afin d'éviter les phénomènes de surpression, pouvant occasionner des projections du liquide.

Au sortir de la glacière, l'organe, saisi à l'aide de pinces, est plongé immédiatement dans deux fois son poids de solution d'acide picrique refroidie (10 cm³ pour les petits organes) et divisé en menus morceaux à l'aide de ciseaux. Liquide et pulpe d'organe sont transvasés rapidement dans le ballon distillatoire où l'on place préalablement une bille de verre. On rince la capsule avec un peu de solution d'acide picrique glacée, que l'on ajoute dans le ballon, avec 10 cm³ d'alcool à 95°. Le ballon est réuni rapidement au corps de l'appareil distillatoire et chauffé à douce chaleur jusqu'à début d'ébullition.

On réduit alors le chauffage et l'appareil se comporte comme un réfrigérant à reflux, sans qu'il y ait distillation. L'opération se poursuit sans difficultés, sauf pour les poumons ; dans ce cas, la production d'une mousse abondante nécessite une surveillance continue de l'appareil. Après 30 minutes, on augmente le chauffage et la distillation s'effectue. On recueille 10 cm³ de distillat. La solution, transvasée dans un petit flacon émeri bien

hermétique, est prête à être spectrographiée. Cette solution se conserve plusieurs mois sans changement de titre.

Le sang, prélevé dans un flacon émeri taré, est rendu incoagulable par addition d'un peu d'oxalate de potassium.

Pour le dosage, 30 g., environ sont versés dans l'appareil renfermant déjà 200 cm³ de solution d'acide picrique, on agite rapidement pour déclencher l'hémolyse et, après addition de 10 cm³ d'alcool, le ballon est réuni à l'appareil distillatoire.

Ici, le chauffage se fait au bain-marie, pour éviter la calcination de la purée globulaire au fond du récipient. L'opération est continuée comme précédemment.

La graisse, hachée en fins morceaux, est introduite dans l'appareil avec son poids d'alcool à 95° picriqué. Après 2 heures de digestion, à feu doux, on distille et on recueille l'alcool.

Quel que soit l'organe d'où l'on est parti, un premier cliché, effectué directement sur le distillat, indique si le benzène y est présent et fixe un ordre de grandeur. Si l'absorption est intense, des dilutions judicieuses dans l'alcool à 95° permettent de trouver rapidement la concentration optimum pour le dosage qui peut alors être effectué avec le maximum de précision. Le résultat final est facilement calculé, il est fonction des dilutions effectuées et du poids d'organe mis en œuvre.

Les résultats sont exprimés pour 100 g., d'organe, de sang ou de graisse.

Avantages de ce dosage.

Il permet une séparation rapide et commode du benzène des organes en une seule manipulation. Les solutions obtenues sont stables et les dosages peuvent être effectués, sans inconvénient, longtemps après la distillation. Il est possible, comme nous l'avons indiqué, à un seul manipulateur, muni des 2 appareils distillatoires, d'effectuer, dans les 24 heures, toutes les opérations correspondant aux principaux organes d'un Chien.

Enfin, nous retrouvons ici les deux avantages notés lors de l'application au dosage du benzène dans l'atmosphère : inaltérabilité des solutions permettant de recommencer les clichés, autant de fois qu'il est nécessaire et conservation de ceux-ci comme test permanent des résultats trouvés.

TROISIÈME PARTIE

INTOXICATIONS EXPÉRIMENTALES

Ayant mis au point une méthode permettant de doser le benzène dans l'atmosphère et dans les viscères, nous avons pu aborder l'expérimentation sur l'animal.

Nous désirions, non seulement éclaircir le mécanisme de l'intoxication benzénique en étudiant la localisation du toxique dans les organes, mais aussi, rechercher son action sur les divers constituants chimiques du sang.

En effet, les solvants volatils, en raison de leur affinité pour les lipides, modifient la perméabilité cellulaire. On peut donc penser qu'en agissant sur les hématies le benzène peut, par ce mécanisme, troubler la répartition érythro-plasmatique des ions. R. FABRE [57] a signalé des faits comparables avec les anesthésiques et mis en lumière les altérations du sang dans les intoxications professionnelles. Peu d'auteurs ont étudié l'influence du benzène sur les constituants chimiques du sang. Cela tient probablement au fait que la plupart des expérimentateurs, beaucoup plus cliniciens que biochimistes, se sont intéressés plus particulièrement au syndrome hématologique ou humoral.

C. G. SANTESSON [177], en 1897, signale le premier que, dans trois cas, le sang de ses Lapins intoxiqués par voie sous-cutanée, donne un sérum d'aspect laiteux, dû à une émulsion grasseuse très fine. S. H. HURWITZ et C. K. DRINKER [102], en 1915, font la même constatation, ainsi que SCHULLOWA [183], sur des animaux intoxiqués par voie respiratoire ou sous-cutanée.

H. BORUTTAU et E. STADELMANN [18] constatent, par contre, chez des leucémiques traités par le benzène, une diminution des graisses du sang, et P. MITNIK et S. GENKIN [153], en examinant le sang de sept ouvriers intoxiqués ne trouvent une augmentation du cholestérol que dans deux cas. Pour eux le taux du cholestérol sanguin, même dans les cas graves, reste dans les limites de la normale. Par contre, M. NIKULINA et Z. GETMANN [158] constatent, chez des ouvriers, une augmentation des lipides du sang.

L'augmentation de la bilirubinémie a été signalée, chez des ouvriers, par A. BERGHAUS [11]. Les auteurs italiens trouvent une hyperuricémie qui apparaît à la suite de la destruction leucocytaire. Pour CAVAGLIANO [27], la réserve alcaline n'est pas modifiée.

F. SARTORIUS et M. SUDHUES [178], en 1933, ont cherché sur des Lapins intoxiqués quotidiennement, pendant de longues périodes, par les vapeurs de benzène, les variations des lipides, de l'azote résiduel et des acides aminés. Ils utilisent, pour le dosage des lipides, la méthode de RUCKERT, basée sur l'action inhibitrice du sérum considéré, vis-à-vis de l'hémolyse d'hématies par la saponine ; cette action étant d'autant plus intense que la teneur du sérum en lipides est plus élevée.

Les auteurs ne peuvent tirer aucune conclusion de ces recherches, en raison de l'imprécision de la méthode et ne trouvent parallèlement aucune modification des acides aminés et de l'azote résiduel au cours de l'intoxication.

S. B. SHACHNOVSKAIA [187] ne devait pas, d'autre part, retrouver de variations du cholestérol chez des animaux intoxiqués par des vapeurs de benzène.

Les variations des constituants chimiques du sang, sous l'influence des solvants volatils, ont été étudiées pour les anesthésiques dans les laboratoires du professeur R. FABRE et, pour les pétroles du Caucase, par les auteurs Russes [126]. Ces modifications sont mal connues dans le cas du benzène, les résultats obtenus étant peu nombreux et souvent contradictoires.

Ces faits nous ont conduit à reprendre cette étude, dans le but de rechercher s'il existait, sous l'influence de l'intoxication

benzénique, des modifications dans les taux des principaux constituants du sang et dans la répartition érythro-plasmatique de certains anions et cations ; variations dues à une modification de la perméabilité cellulaire sous l'influence de ce solvant. Mais avant de réaliser des intoxications expérimentales, un certain nombre de problèmes se présentaient à nous. Il nous fallait, en effet, déterminer le toxique à utiliser, sa voie d'introduction et, l'animal d'expérience étant choisi, la dose de toxique à employer.

Nous nous étions assigné pour but la réalisation d'intoxications benzéniques typiques aiguës et chroniques, afin d'étudier le comportement des animaux et l'action du toxique sur leur organisme.

Le test classique de l'intoxication benzénique étant constitué par les modifications hématologiques, nous avons dû établir régulièrement les formules sanguines des animaux en expérience, afin de suivre pas à pas les progrès de l'intoxication.

Tous ces points étant éclaircis, nous avons pu rechercher si, parallèlement aux modifications des éléments figurés, l'intoxication ne se manifestait pas par des variations spécifiques des constituants chimiques du sang.

Enfin, nous avons terminé l'étude expérimentale des intoxications par la recherche de la localisation et de l'élimination du benzène.

CHAPITRE I

- - -

TOXICITÉ COMPARÉE DU BENZÈNE ET DE SES HOMOLOGUES

CHOIX DU TOXIQUE UTILISÉ DANS NOS EXPÉRIENCES

L'intoxication benzénique professionnelle se produit presque toujours sous l'influence du benzol, mélange de benzène et de ses homologues, accompagné d'impuretés.

La proportion de ces différents constituants étant très variable, les expérimentateurs ont étudié séparément l'action de chacun d'eux.

Ils ont, en particulier, recherché à quelle substance était due la toxicité du benzol et si l'un des constituants agissait spécifiquement sur les organes sanguiformateurs.

Les résultats apportés par les chercheurs se montrèrent souvent contradictoires.

Ceci peut s'expliquer par les conditions différentes dans lesquelles ces auteurs expérimentaient : voie d'introduction, animal utilisé, test de toxicité choisi, composition et pureté variables des toxiques employés. C'est ainsi que la teneur du benzol en benzène est essentiellement variable et que le toluol commercial peut renfermer jusqu'à 15 p. 100 de benzène.

Pour C. G. SANTESSON [177], le benzol, par voie sous-cutanée, est plus toxique que le benzène, puisqu'il détermine les mêmes symptômes toxiques à dose plus faible. L. LEWIN [139] devait trouver les mêmes résultats en utilisant la voie respiratoire.

A. CHASSAVANT et M. GARNIER [32], en 1903, étudient la toxicité comparée du benzène et de ses produits de substitution, sur le Cobaye intoxiqué par voie intrapéritonéale. Ils utilisent, comme test, l'apparition de convulsions et l'hypothermie.

Dans ces conditions, le toluène se montre le plus toxique, puis viennent le benzène et le xylène.

K. B. LEHMANN [134] indique que le toluène provoque la narcose du Chat, plus rapidement que le benzène.

W. ENGELHARDT et W. ESTLER [53], utilisant le Lapin et le Chat et considérant la dose capable de provoquer la narcose profonde, classent par ordre de toxicité, le xylène puis le toluène et enfin le benzène. Sur la Souris blanche, avec comme test la mort de l'animal, le toluène se montre plus toxique que le benzène [55].

Si, des travaux de ces auteurs, on peut conclure à une moindre toxicité du benzène par rapport à ses homologues, on arrive à une conclusion inverse avec KOBERT [115] qui trouve le benzol plus toxique que le toluol.

J. RAMBOUSEK [173] indique que les vapeurs de benzène sont plus toxiques que celles de toluène, dont il faut une dose triple pour provoquer la narcose profonde chez le Chien. Pour T. FERGUSON [62] également, le benzène est plus toxique que le toluène et c'est aussi la conclusion de S. MEYER [150] qui, expérimentant sur le Rat, trouve le toluène et le xylène moins narcotiques et moins toxiques que le benzène.

A. PUGLIESE [172], en 1922, après avoir réalisé des intoxications de divers animaux de laboratoire par inhalation de toxique, conclut que le benzène pur a une action plus intense et plus rapide que le produit commercial.

Jusqu'ici, nous n'avons envisagé que l'action narcotique ou toxique du benzène et de ses homologues. C'est à L. SELLING [186] qu'on doit d'avoir dissocié la production d'accidents aigus, de l'action sur les éléments du sang et les organes sanguiformateurs.

Il note, d'une part, qu'avec le toluène, la narcose se produit plus lentement qu'avec le benzène et sans phénomènes neuro-irritants, mais qu'elle persiste plus longtemps. D'autre part, par injection sous-cutanée, le toluène ne provoque pas, comme le benzène, l'agranulocytose. L. SELLING [186] note seulement une diminution initiale des globules blancs, facilement compensée par la moelle osseuse, en état d'hyperplasie marquée.

J. J. BATCHELOR [9], en 1927, étudie comparativement, sur le Rat l'action du benzène, du toluène et du xylène.

Par inhalation, la dose narcotique et mortelle est de 5 mg. par litre pour le toluène et le xylène. A la concentration de 7 mg., 7,

le benzène n'a qu'une action irritante et neuro-excitante, se traduisant par une légère incoordination et par des tremblements.

Par contre, l'effet narcotique du toluène et du xylène est pratiquement nul avec des doses plus faibles ; ils n'occasionnent pas de lésions anatomiques appréciables, leur action sur les éléments du sang et sur la courbe de poids est extrêmement faible. Le benzène, au contraire, même aux doses minimales de 1 mg., 5 par litre, administrées 18 à 20 heures par jour durant une semaine, produit une profonde leucopénie, avec une diminution du poids de 15 p. 100.

On peut conclure, de ces expériences, que si l'effet narcotique du toluène et du xylène est plus intense, à des concentrations qui d'ailleurs se rencontrent rarement dans l'industrie, ils n'ont pas, sur les organes sanguiformateurs, l'action nocive que produit le benzène, même à un taux très faible.

Une étude comparative d'échantillons de benzol, de pureté variable, depuis le produit commercial à 90 p. 100 jusqu'au benzène purifié, effectuée sur des Lapins intoxiqués chroniquement par voie respiratoire, a permis à C. P. MAC CORD [145] de conclure que l'intoxication provoquée par ces divers produits était due à la présence de benzène. Il semble donc que l'on puisse attribuer à ce corps, la plus grande part de l'action toxique produite par le benzol, lors de ses emplois industriels.

En présence de ces résultats, nous avons choisi le benzène, pour réaliser nos intoxications.

Le benzène est, en effet, un produit parfaitement défini ; il s'oppose en cela au benzol de composition essentiellement variable.

Nous nous sommes demandé à quel degré de pureté devait être amené le benzène pour réaliser des intoxications types. T. F. HARRINGTON [91] avait déjà attiré l'attention sur le rôle des impuretés et J. J. BATCHELOR [9] signale les possibilités de leur intervention, pour compliquer le tableau clinique de l'intoxication. L. LEWIN [139] et K. B. LEHMANN [134] ont même attribué à ces impuretés la toxicité plus élevée du produit brut par rapport au produit pur, mais, c'est C. P. MAC CORD [145] qui, surtout, a étudié la question dans son ensemble. Il a recherché quel était

le rôle toxique joué par les impuretés que le benzène renferme toujours en faibles quantités : thiophène, impureté constante du benzène commercial, sulfure de carbone présent dans le benzène brut et éliminé par rectification, méthyl-disulfide, acétonitrile, amylène, etc... Ces substances ont été administrées séparément, au Lapin, par voie respiratoire. C. P. MAC CORD [145] conclut qu'aucune d'elles n'a une action toxique pouvant être confondue avec celle du benzène, seul responsable des accidents produits.

L'obtention d'un produit ne contenant aucune trace d'impureté nécessite une préparation longue et coûteuse, nous avons donc renoncé à son emploi.

Nous avons utilisé le benzène officinal, cristallisable, dont les constantes physiques sont bien déterminées. Il est accompagné de traces minimales de thiophène qui, comme nous l'avons signalé, ne joue pas de rôle important dans l'intoxication.

Le benzène officinal renfermant de faibles quantités d'eau, nous l'avons, dans tous les cas, rectifié par distillation à 80°. L'eau distille au début, donnant aux premières fractions un aspect trouble. Celles-ci correspondent à 1/10^e environ de la quantité totale, nous les avons rejetées, ainsi que les portions terminales.

Nous avons vérifié les constantes physiques du distillat recueilli et effectué les réactions d'identité. Nous y avons recherché et dosé le thiophène, par un procédé indiqué par C. P. MAC CORD [145] et qui utilise la réaction de coloration fournie par le composé, en présence de solution sulfurique d'isatine. L'auteur effectue parallèlement cette réaction, sur l'échantillon de benzène à analyser et sur un benzène exempt de thiophène, additionné de quantités connues et croissantes de ce corps.

Nos échantillons renfermaient, en moyenne, 0,10 p. 100 de thiophène, proportion que nous pouvions considérer comme négligeable.

CHAPITRE II

INFLUENCE DE LA VOIE D'INTRODUCTION CHOIX DU MODE D'INTOXICATION

Le benzène se comporte différemment dans l'organisme suivant la voie d'introduction. Introduit sous la peau, il passe dans la circulation veineuse et, par le cœur droit, gagne les poumons où il est en grande partie éliminé ; une faible partie seulement du toxique atteint le cerveau. Pour cette raison, l'action sur le système nerveux passe au second plan, l'action sur le sang, les glandes et les organes parenchymateux se plaçant, au contraire, au premier rang. Ces effets sont d'autant plus nets que l'intoxication est plus prolongée.

Le benzène, pénétrant par la voie digestive ou intrapéritonéale, serait, d'après G. HULTGREN [101], rendu moins nocif, par le foie, qui le transformerait partiellement en phénol.

Absorbé, à l'état de vapeur, par les voies respiratoires, le benzène, par la circulation capillaire des poumons, gagne le cœur gauche et atteint vite le cerveau. Pour cette raison, apparaissent au premier plan les effets sur la substance nerveuse.

Presque tous les auteurs, qui ont voulu étudier expérimentalement l'intoxication chronique par le benzène, l'ont réalisée par injection sous-cutanée du toxique mélangé à son volume d'huile d'olive. Ce mode d'administration est, en effet, commode car il permet de connaître exactement la quantité de produit mise en œuvre. Par ce procédé, on réalise facilement, presque automatiquement, des syndromes typiques d'intoxication.

Il est à présumer que l'action du benzène sur le sang et l'appareil

hématopoïétique, ne dépend pas essentiellement de la concentration du poison, mais de la durée de sa présence dans le sang et dans les tissus.

Beaucoup d'auteurs considèrent donc l'injection sous-cutanée du benzène en solution huileuse comme provoquant la forme la plus chronique d'empoisonnement. Dans ce cas, la résorption étant très lente, il se forme, dans l'organisme, un dépôt de benzène et le carbure passe d'une façon continue dans les tissus. La concentration dans le sang s'élève lentement et atteint une valeur relativement faible à laquelle elle se maintient longtemps.

L'administration par voie sous-cutanée prête cependant à des critiques.

1^o Cette voie d'introduction n'a jamais été la cause d'intoxications chez l'homme.

2^o Les doses utilisées, pour provoquer la leucopénie, sont très élevées par rapport au poids du corps : généralement 1 cm³ par kilog d'animal, dose qui, malgré sa résorption lente, provoquerait, chez l'homme, des accidents immédiats graves.

3^o La réaction locale, souvent constatée au point d'inoculation, peut modifier le comportement de l'animal à l'intoxication.

A côté du mode d'introduction hypodermique, on doit signaler les voies intrapéritonéale et intraveineuse qui ont été utilisées par quelques expérimentateurs, sans résultats appréciables d'ailleurs, les animaux succombant rapidement sans lésions spécifiques. Les voies d'absorption du benzène susceptibles de provoquer des intoxications chez l'homme sont de trois ordres : voie digestive, voie cutanée, voie respiratoire.

Les intoxications dues à l'absorption du benzène par voie digestive peuvent se produire dans certains cas de suicide ou à la suite d'une erreur. Les accidents graves sont toutefois rares ; en effet, l'ingestion d'une dose massive provoque des vomissements qui éliminent, en grande partie, le poison.

L'administration du benzène par voie buccale, dans un but thérapeutique, a pu provoquer des accidents qui, en raison des faibles doses prescrites, ne peuvent revêtir un caractère aigu.

Des intoxications avec leucopénie et hémorragie ont pu être constatées, lorsque la courbe descendante des leucocytes n'a pas été surveillée constamment. Actuellement d'ailleurs, la thérapeutique benzénique est suffisamment au point pour que les accidents soient fort rares.

L'absorption par la peau, considérée comme probable à la suite des travaux de C. G. SANTESSON [177], a été démontrée expérimentalement par N. W. LAZAREW et ses collaborateurs [129]. Ces auteurs ont calculé le taux de pénétration du benzène d'après la quantité expirée par l'animal, en tenant compte de la surface et de la durée du contact. Un Lapin a une patte immergée dans du benzène; un dispositif spécial permet à cet animal trachéotomisé de respirer l'air contenu dans un spiromètre et d'expirer dans un autre. Cet air expiré, déshydraté et privé d'anhydride carbonique, passe sur un gel de silice dont l'augmentation de poids est due au benzène éliminé. Ces auteurs démontrent ainsi le passage du benzène à travers la peau. Par l'intermédiaire du sang, le toxique gagne le cœur droit, puis le poulmons d'où il est éliminé.

L'urine des Lapins maintenus plusieurs heures dans ces conditions, renferme des phénols provenant de l'oxydation du benzène absorbé.

Dans un second groupe d'expériences, les auteurs, à l'aide de l'appareil de S. P. MATWEJEW, Y. B. PRONIN et O. Y. FROST [147], ont tracé la courbe d'élimination du benzène, dans l'air expiré, en fonction du temps. Après contact de 3 à 4 minutes de la patte de l'animal avec le benzène, la vapeur de cette substance peut être caractérisée dans l'air expiré. On peut même penser que le benzène s'y trouve plus tôt, mais en quantités trop faibles pour être décelé.

La teneur en benzène de l'air expiré augmente peu à peu et, après 30 à 40 minutes, elle se stabilise au taux de 1 mg., 5 par litre. Son taux de pénétration ainsi déterminé est de 0 mg., 016 par cm² et par minute. En réalité, il est plus élevé, car on ne tient pas compte de la fraction oxydée dans l'organisme. Si la patte du Lapin est retirée du benzène et séchée avec

précaution, le taux du toxique dans l'air expiré diminue, d'abord brusquement, puis moins vite.

C. P. MAC CORD [145] a étudié récemment, sur le Lapin, l'action du benzène administré par voie cutanée, les poils des animaux étaient préalablement coupés et toutes précautions prises pour éviter l'inhalation de benzène par l'animal. La mort des animaux survient en moins de 11 jours, sans qu'on puisse constater de modifications caractéristiques du sang. Cet auteur signale dans cette expérience, l'existence de deux causes d'erreur : d'une part, l'action locale du toxique, provoquant l'œdème et l'érythème, puis la nécrose, d'où retentissement sur l'état général ; d'autre part, l'influence du pansement empêchant l'élimination des déchets organiques ayant lieu normalement par la peau. En raison de ces faits, il est impossible de faire agir sur des animaux, pendant de longues périodes, de petites quantités de benzène, condition nécessaire pour produire la leucopénie caractéristique. Ce mode d'introduction a d'ailleurs peu d'importance dans la pratique, car il s'accompagne toujours d'une absorption beaucoup plus importante du poison par voie respiratoire.

L'appareil respiratoire est véritablement la voie principale de pénétration du toxique. Des centaines d'intoxications, tant aiguës que chroniques, dont bon nombre mortelles lui sont attribuables.

Si ce mode d'intoxication est, en général, délaissé par les expérimentateurs, c'est en raison des difficultés que présente la mise au point d'un dispositif adéquat et des échecs des chercheurs qui pendant longtemps n'ont pu parvenir à provoquer, par cette voie, un syndrome clinique et hématologique typique de l'intoxication benzénique.

C'est ainsi que C. G. SANTESSON [177], L. SELLING [186], W. C. WHITE et A. M. GAMMON [210] expérimentant sur le Lapin, K. B. LEHMANN [134] et B. LUIG [142] sur le Chien, M. L. MGEBROW [152] sur le Rat n'y sont pas parvenu.

H. A. GARDNER, cité par J. J. BATCHELOR [9], paraît être le premier à l'avoir enfin réalisée, par exposition prolongée de Lapins

aux vapeurs de benzol. Puis, en 1920, H. G. WEISKOTTEN et ses collaborateurs [206] y parviennent également, sur le Lapin, intoxiqué 10 ou 24 heures par jour, en utilisant la dose maxima subléthale.

La leucopénie apparaît le 2^e jour, avec chute des leucocytes de 12.000 à 1.500, le niveau le plus bas étant atteint en 6 à 8 jours. L'intoxication a la même allure générale que celle réalisée par voie sous-cutanée.

Expérimentant dans un esprit différent, F. SARTORIUS et M. SUDHUES [178], en 1933, montrent que des Lapins peuvent vivre sans danger, plusieurs heures par jour, pendant un an et demi dans une atmosphère contenant 13 mg., 6, puis 27 mg., 2 de benzène par litre d'air.

Si deux animaux sont morts, après 2 mois, avec amaigrissement et diminution du taux des leucocytes et des hématies, les autres ont résisté. La phase critique est la période d'accoutumance où l'on constate une diminution du poids et du taux des globules blancs.

Les auteurs soulignent l'existence d'un parallélisme entre l'amaigrissement et la diminution des leucocytes et pensent qu'on peut, par la courbe de poids, se faire une idée de la tolérance des ouvriers vis-à-vis du benzène. L'intoxication chronique n'a pu être réalisée, par inhalation, sur le Chat, qui, d'après K. B. LEHMANN [134], meurt rapidement d'accidents pulmonaires, ni sur le Chien, qui s'est montré particulièrement résistant.

Le pourcentage d'absorption du benzène par la voie respiratoire a été étudié expérimentalement par K. B. LEHMANN [133], en 1910, sur l'homme et sur l'animal. Dans le premier cas, le sujet, muni d'un masque à soupape, respire un air de teneur constante en benzène, circulant dans une cage ventilée. Le benzène de l'air expiré est retenu dans un barboteur à huile de paraffine et dosé par détermination de l'augmentation de poids de ce barboteur. Le volume expiré est mesuré à l'aide d'un compteur.

L'homme respirant 5 à 10 minutes, dans une atmosphère de 10 à 16 mg. par litre, absorbe 80 à 85 p. 100 du benzène inhalé. Pour le Lapin, le coefficient d'absorption est, dans la première demi-heure, de 37 à 54 p. 100. Il diminue plus ou moins, au cours d'une inhalation prolongée, pour devenir constant lorsque

l'expérience dure plusieurs heures. Il varie avec les individus et est, en moyenne, de 30 à 40 p. 100. Pour certains animaux il peut tomber à 10 p. 100. Ces différences semblent provenir de la capacité plus ou moins grande d'oxyder le benzène en phénol. Il se produirait un certain équilibre entre l'absorption et l'oxydation du poison.

N. W. LAZAREW et ses collaborateurs [127] ont recherché la teneur du sang en benzène et sa vitesse d'élimination suivant les différentes voies d'introduction. Chez un Lapin, respirant pendant 15 minutes dans une atmosphère titrant 50 mg. de benzène par litre, la teneur en benzène du sang atteint 100 à 130 mg. par litre.

Le sang artériel se montre, au cours de l'inhalation, plus riche en toxique que le sang veineux, le phénomène inverse se produit au cours de l'élimination qui se fait très rapidement, le taux diminuant, dans la proportion des 4/5, dans les 30 minutes qui suivent la fin de l'intoxication. M. PÉRONNET [169], a obtenu sur le Cobaye, des résultats analogues, la concentration en benzène du sang augmente presque linéairement avec le temps d'inhalation. Le benzène disparaît très rapidement du sang après ce sation de l'intoxication (50 p. 100 en 5 minutes).

Malgré les avantages présentés par l'introduction du benzène par voie sous-cutanée, pour réaliser des intoxications chroniques, nous avons résolu d'employer la voie respiratoire.

Nous désirions, en effet, pour l'étude chez l'animal, nous rapprocher des conditions réalisées en clinique humaine, or nous savons que les intoxications benzéniques les plus nombreuses sont, de loin, celles réalisées, dans l'industrie, par inhalation du toxique.

Nous espérons, en outre, pouvoir, même avec ce mode d'absorption, obtenir les symptômes classiques, en faisant varier, soit les modalités de l'inhalation, soit l'espèce animale en expérience, soit encore la dose de toxique employée.

Nous allons, tout d'abord, étudier chacun de ces points, puis, nous montrerons comment nous sommes arrivé à obtenir, chez l'animal, le tableau classique de l'intoxication benzénique.

CHAPITRE III

DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL UTILISÉ POUR L'INTOXICATION PAR INHALATION

Les premières intoxications par voie respiratoire, ont été réalisées par FÉLIX [61], puis par H. FÜHNER [74], sur des Rats et des Souris placés dans une cloche, en atmosphère confinée et sans ventilation. Un tel procédé présente deux graves inconvénients.

1° Le titre de l'atmosphère en vapeurs de benzène est variable suivant le niveau considéré, ces vapeurs, très denses, s'accumulant à la partie inférieure de la cloche.

2° L'animal se trouve rapidement dans des conditions physiologiques anormales, en raison de l'abaissement progressif du taux d'oxygène et de l'augmentation concomitante de l'anhydride carbonique.

On supprime ces inconvénients par la ventilation et en renouvelant l'atmosphère dans laquelle se trouve placé l'animal.

La principale difficulté est de réaliser, pour alimenter la cage, un air de concentration fixe en vapeurs toxiques.

Le moyen le plus simple, étudié et employé par K. B. LEHMANN [133], en 1910, consiste à faire passer dans le solvant, à l'aide d'un flacon à double tubulure, le courant d'air qui entraîne les vapeurs à étudier.

On peut opérer de deux manières : ou bien, en faisant passer l'air à la surface du liquide, ou encore en l'y faisant barboter et dans ce cas, la vitesse d'évaporation dépend de la profondeur à laquelle plonge le tube d'arrivée de l'air.

Le niveau du liquide doit être maintenu constant et, au fur et à mesure de l'évaporation, de nouvelles portions devront être ajoutées. L'évaporation provoque un abaissement de température. On peut éviter cet inconvénient en plaçant le flacon dans un thermostat.

La concentration en vapeurs toxiques, dans l'atmosphère, est calculée en divisant le poids du liquide évaporé par le nombre de litres d'air ayant traversé l'appareil. Ce taux peut être vérifié par l'analyse de l'atmosphère produite.

Il est évident que ce mode opératoire n'est utilisable que dans le cas d'un solvant pur. S'il s'agit d'un mélange, chaque constituant s'évapore alors indépendamment des autres ; le plus volatil disparaît en plus grande quantité au début de l'expérience, faussant complètement l'opération. W. P. YANT et F. G. FREY [214] ont remédié à cet inconvénient par un dispositif ingénieux, très répandu en Amérique. Son montage est compliqué et coûteux et comme nous utilisons le benzène pur, nous avons employé un dispositif dérivé de celui de K. B. LEHMANN [133].

Nous avons opéré, dans la plupart des cas, avec des atmosphères à concentration faible en benzène, 15 à 20 mg. par litre. Ce liquide étant très volatil, le flacon qui le renferme n'est pas placé sur le trajet principal de l'air, mais sur une dérivation qui ne laisse passer à la surface du benzène qu'un faible volume. Les vapeurs ainsi obtenues sont diluées dans le courant principal. La vitesse d'évaporation du liquide et, par conséquent, la concentration de sa vapeur dans le courant d'air final est fonction :

- 1° De la vitesse de ce courant d'air qui doit être constante, ce dont on s'assure par un manomètre différentiel.
- 2° Du débit relatif des deux fractions du courant d'air, qui est fonction du diamètre des tubes d'alimentation.
- 3° De la distance qui sépare, dans le dispositif de volatilisation, la surface du benzène du tube d'adduction d'air.
- 4° De la température qui doit rester constante.

Notre système d'évaporation (fig. 8) est constitué par un flacon rodé (A) de 250 cm³, à large ouverture, qui renferme le benzène. Nous y adaptons un bouchon de liège percé de trois trous. Par l'un d'eux, un tube de verre amène le courant d'air, un autre sert à la sortie de l'air chargé de benzène dont le niveau constant dans le flacon est assuré par un dispositif d'alimentation automatique.

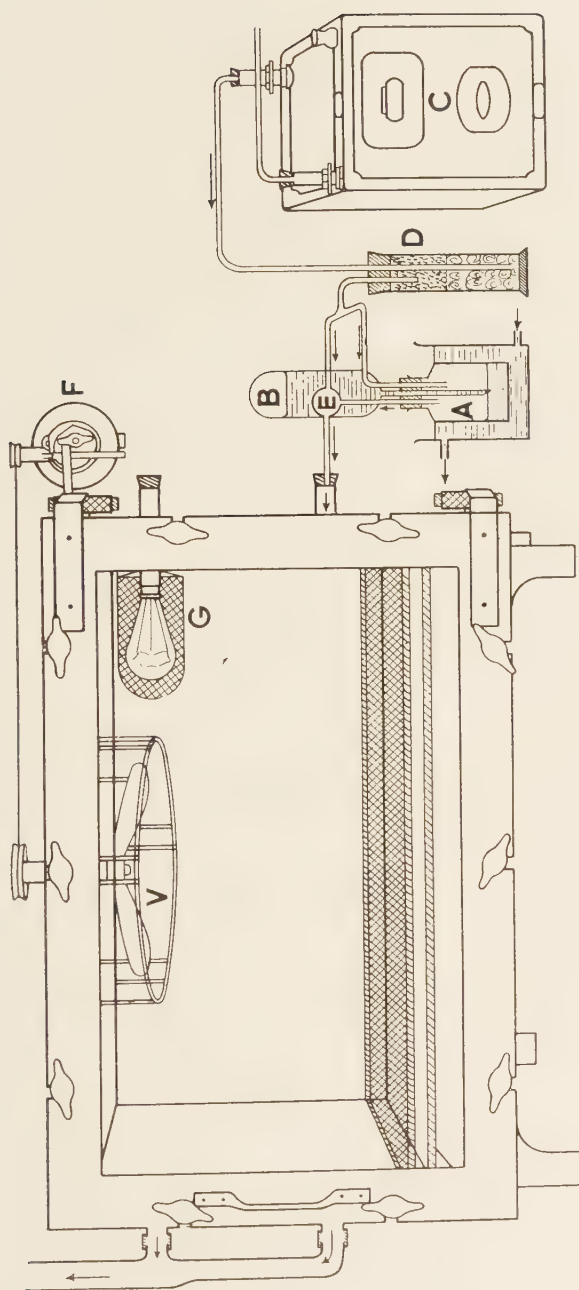


Fig. 8. — Schéma de l'appareil utilisé pour réaliser les intoxications expérimentales par inhalation de vapeurs de benzène.

- | | | | |
|---|--|---|--|
| A | Flacon de 250 cm ³ . | E | Boute où s'effectue le mélange gazeux. |
| B | Amphoule de verre de 250 cm ³ . | F | Dynamo. |
| C | Compteur indiquant le débit gazeux. | G | Amphoule électrique. |
| D | Filtre d'amiante et charbon activé. | V | Ventilateur. |

Nous l'avons réalisé simplement à l'aide d'une ampoule de verre (B) de 250 cm³ remplie de benzène, fermée à l'une de ses extrémités et prolongée à l'autre par un long tube de verre terminé en biseau. Ce tube traverse le bouchon par le troisième trou et le biseau vient affleurer, dans le flacon, la surface du benzène. L'abaissement de la surface du liquide, provoqué par son évaporation, est compensée immédiatement par une nouvelle arrivée de solvant venant de l'ampoule. Le flacon est plongé dans un récipient avec circulation d'eau qui maintient la température constante pendant l'opération.

OBTENTION D'UNE ATMOSPHÈRE DE CONCENTRATION FIXE EN BENZÈNE.

Dans presque toutes nos expériences, nous avons choisi comme débit de l'atmosphère toxique 1.200 litres heure, chiffre adopté par K. B. LEHMANN [133]. A ce taux, les animaux se trouvent dans des conditions telles que la quantité de benzène qu'ils absorbent ne peut modifier d'une manière appréciable la concentration en toxique de l'atmosphère de la cage. Le courant d'air est produit par une pompe aspirante et soufflante mue par une dynamo, dont la vitesse est réglable par un potentiomètre-rhéostat. L'air aspiré dans l'atmosphère extérieure est envoyé vers le dispositif d'évaporation. Il passe auparavant sur un tampon de coton qui le prive de ses poussières, puis sur plusieurs lits d'amiante qui retiennent les gouttelettes d'huile pouvant provenir du moteur, enfin, sur du charbon activé qui fixe les produits volatils que peut renfermer l'air. Il traverse ensuite un compteur (C), indiquant le débit, puis est, de nouveau, purifié en (D) sur amiante et charbon activé.

Le courant d'air est alors divisé, par un tube en T, en deux fractions inégales. La plus faible passe à la surface du benzène, puis se mélange ensuite dans une boule (E) avec le courant principal qui est alors envoyé dans la cage. Tout caoutchouc a été éliminé de l'appareil à partir du moment où le benzène entre dans le circuit. Opérant, pour les intoxications chroniques, avec une atmosphère de titre constant en benzène, nous l'avons

réalisée empiriquement, d'une façon définitive, en réglant le débit relatif des 2 courants.

La diminution de poids du flacon de benzène permet de calculer le titre de l'atmosphère en fonction du volume d'air écoulé pendant le temps considéré.

CAGE RESPIRATOIRE.

Les cages respiratoires utilisées varient suivant les expérimentateurs. Pour les petits animaux, on se contente souvent de cloches de verre, à bord rodé, adhérentes à une surface dépolie. Pour les autres, on utilise des chambres à gaz, de formes et de dimensions variables, pouvant être closes hermétiquement, des orifices ayant été ménagés pour l'entrée et la sortie de l'air et pour permettre les prélèvements.

On ne peut obtenir, dans les cages, une concentration homogène en vapeurs toxiques, sans une ventilation constante ; c'est ainsi que K. B. LEHMANN [133] trouve, qu'en l'absence de ventilation, la concentration de l'air en benzène est quatre fois plus forte à la partie inférieure qu'à la partie supérieure.

Le ventilateur est placé, soit contre la cloison où se trouve l'orifice qui amène le courant d'air, soit en position horizontale à la partie supérieure de la cage. Il est séparé des animaux par un grillage. Lorsque l'air est ainsi brassé la forme de la cage n'intervient pas. La chambre à gaz, utilisée pour nos expériences, est une enceinte parallélépipédique en tôle épaisse emboutie, vernie intérieurement. Elle possède quatre orifices latéraux circulaires de 2 cm. de diamètre pouvant être fermés à l'aide de bouchons. La cage a les dimensions suivantes :

Largeur	0 m., 80
Profondeur	0 m., 40
Hauteur	0 m., 50

soit un volume de 0 m³ 160.

L'une des faces, vitrée, est mobile autour d'une charnière latérale et constitue la porte. Elle permet l'introduction des animaux et l'observation constante de leur comportement. Cette porte, munie d'un joint en caoutchouc, peut être fermée hermétiquement à l'aide de 10 vis à pression.

L'animal repose sur un treillage de fer galvanisé. Un plateau de tôle, placé au-dessous, permet de recueillir les urines. Le ventilateur (V) disposé contre la paroi supérieure de la cage est protégé par un grillage, il est mû par une petite dynamo (F) réglée par un potentiomètre et tourne à la vitesse de 60 tours minute. Un thermomètre et un psychromètre fixés dans la cage, près de la vitre, permettent de suivre les variations atmosphériques. L'air chargé de benzène arrive par un des orifices latéraux et ressort par les deux orifices opposés, de telle façon que la surpression soit nulle à l'intérieur de la cage.

K. B. LEHMANN [133], puis son élève O. BAMESREITER [7] réalisent, avant l'expérience, l'atmosphère toxique dans la cage, par passage d'air chargé de benzène pendant trente minutes. L'animal est alors introduit par une trappe. Nous avons jugé plus simple de réaliser cette atmosphère toxique de départ, par évaporation instantanée du benzène dans la cage, aussitôt après sa fermeture. Dans ce but, on verse par l'orifice restant libre, le benzène, à l'aide d'une pipette, à la surface d'un papier filtre entourant une ampoule électrique (G). L'orifice est bouché et la chaleur produite par l'ampoule allumée, évapore le benzène que le ventilateur répartit immédiatement d'une façon homogène. L'heure et les indications des appareils de mesure sont notées et la circulation d'atmosphère toxique est aussitôt commencée. Nous avons recherché, à plusieurs reprises, par notre méthode spectrométrique, si la teneur en benzène de l'atmosphère de la cage, correspondait à celle indiquée par le calcul. Les résultats ont toujours coïncidé à moins de 10 p. 100 près. Des prélèvements faits dans la cage, à différents niveaux, ont présenté la même teneur en benzène. Enfin, la constance de ce taux, au cours de l'opération, a été vérifiée par des pesées, à intervalles réguliers, du récipient renfermant le toxique et calcul de la concentration en benzène de l'air insufflé.

CONDITIONS DE VIE DES ANIMAUX À L'INTÉRIEUR DE LA CAGE.

Lorsqu'on veut étudier sur des animaux l'action prolongée d'un toxique, par inhalation, il est nécessaire de les placer dans

une atmosphère qui, indépendamment de la présence de ce toxique, soit de composition normale pendant toute la durée de l'expérience.

Cette constatation générale prend une importance plus grande encore dans le cas du benzène, puisque le séjour en atmosphère confinée peut provoquer la polyglobulie et que, d'autre part, I. J. LIFSCHIZ [140] a pu montrer récemment, sur des Souris intoxiquées par le benzène à diverses concentrations, que l'effet toxique augmentait avec l'élévation de la température ambiante.

Lorsqu'un animal vit en milieu confiné, l'atmosphère s'appauvrit en oxygène et s'enrichit en anhydride carbonique et en vapeur d'eau, en même temps que la température s'élève.

L'atmosphère renferme normalement 21 p. 100 d'oxygène et 0,05 p. 100 environ d'anhydride carbonique.

On donne généralement comme conditions physiologiques limites :

$$\text{CO}^2 \leq 1,5 \text{ p. } 100$$

$$\text{O}^2 \geq 17 \text{ p. } 100$$

$$\text{Température} < 25^{\circ}$$

$$60 \text{ p. } 100 < \text{État hygrométrique} < 70 \text{ p. } 100$$

Dans une étude préalable, nous avons recherché les variations de l'état hygrométrique, de la température et, par des prélèvements échelonnés de l'atmosphère, les modifications des taux d'oxygène et d'anhydride carbonique, lorsque divers animaux, Chiens, Lapins, Rats, séjournent plus ou moins longtemps dans la cage. L'analyse des gaz a été faite avec l'eudiomètre de PLANTEFOL.

L'état hygrométrique est mesuré à l'aide du psychromètre. Celui-ci se compose de deux thermomètres complètement isolés et dont l'un est enveloppé d'une mèche de coton constamment mouillée. Le degré d'humidité se déduit de la différence des indications des deux thermomètres. Plus cette différence est grande, moins il y a d'humidité ; au contraire, si les deux thermomètres indiquent la même température, l'humidité de l'atmosphère serait, à son maximum, représentée par 100.

De cette étude nous avons pu conclure que, dans les conditions de nos expériences, la température, l'état hygrométrique, les teneurs en oxygène et en anhydride carbonique restaient dans les limites indiquées précédemment.

Nous devons noter que, en dehors des réactions provoquées par le toxique, les animaux n'ont manifesté aucune répulsion vis-à-vis du dispositif d'intoxication. Le Chien III seul manifesta son impatience en frappant contre le carreau de la cage et en s'efforçant d'arracher ce qu'on laissait à sa portée. Les autres Chiens en intoxication chronique étaient au contraire habitués au traitement journalier et montaient d'eux-mêmes dans la cage. Nous avons même constaté un jour le fait suivant. Le dispositif fournissant le benzène n'ayant pas fonctionné, l'animal refusa de descendre de la cage et l'on put alors recommencer immédiatement la séance d'intoxication. Une impression d'euphorie a d'ailleurs été signalée par des ouvriers manipulant le benzène.

*
* *

CHAPITRE IV

CHOIX DE L'ANIMAL

L'animal de laboratoire le plus couramment utilisé pour l'étude expérimentale de l'action du benzène, est le Lapin, viennent ensuite le Chat, le Cobaye, le Rat puis le Chien.

Nous désirions, au cours de ce travail, d'une part, rechercher les modifications de la composition chimique du sang dans l'intoxication par le benzène et, d'autre part, étudier la répartition du toxique dans les viscères.

Nous avons donc, a priori, intérêt à nous adresser à un animal assez gros pouvant fournir une certaine quantité d'un sang dont la composition soit, normalement, peu sujette aux variations. D'autre part, il était indispensable que les organes soient assez volumineux. Le Chien répondait à ces conditions. Sa masse sanguine étant égale à environ 8 p. 100 du poids du corps, un Chien de douze kilogs aura donc environ mille grammes de sang. On pourra lui en soustraire 100 cm³, sans en modifier d'une façon appréciable la composition. L'organisme réagit à ces saignées par une polyglobulie transitoire, d'une durée de 15 à 20 minutes due, comme l'a montré Léon BINET [16], à une contraction splénique engendrée par l'hémorragie elle-même. Par la suite, le taux des hématies s'abaisse, en raison de l'arrivée, dans le sang circulant, de lymphes et de liquide lacunaire qui viennent le diluer. Le taux des globules blancs diminue de même, mais la chute est précédée d'une leucocytose post-hémorragique transitoire, due à la rétention de ces éléments au cours et surtout à la fin de la saignée. Par suite de l'hypotension, les leucocytes adhèrent aux parois vasculaires pour être remis

ultérieurement en circulation. En quelques jours, le taux des éléments figurés du sang est revenu à la normale.

L'influence de saignées, un peu plus importantes que celles que nous avons pratiquées (2 à 3 p. 100 du poids du corps), sur le taux des albumines sériques du Chien a été étudiée par R. CUVELIER et G. PATOIR [36]. Elles provoquent une diminution transitoire des protides qui reviennent, en 4 à 5 jours, à leur taux primitif. La régénération de la sérine est totale en 48 heures, celle de la globuline, plus tardive, ne débute qu'au 5^e ou 6^e jour. Le rapport sérine/globuline revient alors à son taux primitif. On a signalé également, après la saignée, une augmentation passagère du calcium, du cholestérol et de la glycémie, ainsi qu'une hypercoagulabilité du sang.

Pour vérifier la non influence des saignées successives, que nous désirions effectuer chez nos Chiens, nous avons fait, à un mois d'intervalle, deux prises de sang, de 100 cm³ chacune, sur un Chien d'apparence normale, vivant dans les mêmes conditions que nos animaux d'expérience, mais ne subissant aucune intoxication. Les résultats trouvés pour quelques éléments du sérum, exprimés en grammes par litre, sont indiqués dans le tableau VII.

TABLEAU N^o VII

Variations de quelques constituants du sang chez le chien normal,
sous l'influence de la saignée.

	I	II
	Avant la saignée	Un mois après la saignée
Lipides totaux	18,20	17,70
Rapport $\frac{\text{sérine}}{\text{globuline}}$	1,15	1,10
Calcium.	106	106

Nous avons pensé que, dans ces conditions, nous étions en droit de négliger les modifications résultant des saignées

et que, le Chien, de ce fait, se prêtait très bien à notre expérimentation. Malheureusement cet animal s'était montré, jusqu'à présent, réfractaire à l'intoxication chronique par voie pulmonaire.

K. B. LEHMANN [134] n'a pu la provoquer sur deux Chiens placés quotidiennement 5 à 9 heures par jour dans une atmosphère renfermant 9 mg. de benzène par litre, l'un pendant 27 jours, l'autre pendant 35 jours. Leur poids a augmenté et les animaux ont fort bien supporté cette épreuve. Leur sang ne présente pas d'altérations dignes d'être mentionnées sauf une augmentation du temps de coagulation. L'auteur conclut qu'aux doses utilisées le benzène n'est pas toxique pour ces animaux. B. LUIG [142] faisant inhaler à des Chiens, dans des conditions tout à fait analogues, 7 à 8 heures par jour pendant 23 à 35 jours, des vapeurs de benzène à la concentration de 10 mg. par litre, ne parvint pas non plus à produire, sur les animaux, des symptômes caractéristiques d'intoxication. Malgré les échecs de ces auteurs, nous avons néanmoins choisi le Chien pour nos expériences d'orientation, au cours desquelles nous voulions effectuer un assez grand nombre de dosages sur un même animal.

Nous pensions, en cas d'échec, pouvoir apporter, par des examens sanguins répétés, quelques éléments nouveaux éclairant le mécanisme de la grande résistance de cet animal à l'intoxication benzénique.

Nous avons, par la suite, poursuivi nos recherches sur d'autres animaux.

Nous avons éliminé le Chat qui, comme l'a montré K. B. LEHMANN [134], résiste mal à l'intoxication chronique, puisque la plupart des animaux meurent rapidement d'accidents pulmonaires.

Nous avons utilisé le Lapin, bien qu'il présente pour les recherches qui nous occupent un gros inconvénient, la composition de son sang subissant d'importantes variations, souvent inexplicables, susceptibles de conduire à des interprétations erronées.

De plus, il ne permet pas, comme le Chien, de nombreux prélèvements de quantités importantes de sang. Nous avons

atténué la première difficulté en opérant sur un lot de six animaux, afin de neutraliser autant que possible les variations individuelles et, la seconde, en limitant le nombre des saignées. Nous n'avons fait à chaque animal, que trois prises de sang : une témoin, avant l'intoxication, une seconde après un mois d'intoxication, enfin la dernière après le mois de repos qui suivit la période précédente. La régénération sanguine du Lapin étant rapide nous estimons négligeable, dans ce cas, l'influence de la saignée.

Le Cobaye, a été utilisé par quelques auteurs dans leurs recherches expérimentales sur l'intoxication benzénique. G. FONTANA [69] a pu, par la voie sous-cutanée, provoquer la leucopénie chez cet animal. Néanmoins, le Cobaye est assez résistant à l'intoxication et, d'autre part, une prise de sang de quelques centimètres cubes bouleverse très profondément sa formule sanguine. Nous avons voulu, malgré tout, étudier son comportement à l'intoxication en prenant la précaution de laisser l'animal revenir à la normale après la prise de sang témoin.

Nous avons enfin expérimenté sur le Rat blanc qui s'est montré, entre les mains de J. J. BATCHELOR [9], sensible à l'intoxication benzénique, même à des doses très faibles.

Ce n'est donc pas, en réalité, un choix que nous avons fait, puisque nous avons expérimenté sur presque tous les animaux de laboratoire. Nous espérions ainsi écarter les variations dues à l'espèce utilisée et chercher, en outre, si certains faits, par leur généralité, étaient susceptibles d'illustrer l'intoxication benzénique.

Au cours de l'expérience, les animaux ont été maintenus dans les meilleures conditions d'hygiène et abondamment pourvus de nourriture. Ils étaient pesés chaque semaine et leur formule sanguine était déterminée périodiquement.

Les Chiens étaient laissés en liberté dans une grande pièce bien aérée et promenés régulièrement. Ils étaient nourris de soupe et de viande cuite. Ces animaux étant presque toujours parasités, atteinte se manifestant par une éosinophilie notable, nous leur

avons administré, *per os*, avant de les mettre en expérience, 6 à 8 capsules de fougère mâle et calomel. A une exception près, ce traitement a suffi à les débarrasser définitivement de leurs parasites.

Les Lapins et les Cobayes vivaient séparés dans des cages grillagées, surmontant un plateau destiné à recueillir les excréments et détritüs. Ils étaient nourris de fourrage vert, de feuilles de choux et de son.

Les Rats blancs avaient été divisés en 2 lots, l'un destiné à l'expérimentation, l'autre servant de témoin. Chacun de ces lots était placé dans une grande cage métallique du modèle décrit plus haut. Ils étaient nourris de pain trempé dans du lait.

CHAPITRE V

DOSES DE BENZÈNE UTILISÉES DANS LES INTOXICATIONS EXPÉRIMENTALES

Afin de pouvoir choisir, en connaissance de cause, les doses toxiques pouvant nous conduire, au cours de nos recherches, à des résultats expérimentaux intéressants, il importait de passer en revue les faits déjà acquis dans ce domaine.

INTOXICATIONS AIGÜES.

Les doses provoquant l'intoxication aiguë varient assez peu d'une espèce animale à l'autre. Dans tous les cas, on distingue successivement trois phases. On observe d'abord le *décubitus*, l'animal perd l'équilibre et tombe sur le côté, cette phase est continuée par la *narcose légère*, caractérisée par la disparition des réactions lors du pincement de l'oreille ou de la patte, avec conservation des réflexes cornéens et pupillaires.

Lorsque l'intoxication s'arrête à l'une de ces phases, l'animal reprend très vite son comportement normal. Si, au contraire, la dose utilisée est plus forte ou si l'intoxication est prolongée, on observe la *narcose profonde*, avec disparition du réflexe cornéen et abaissement de la température rectale. La mort survient à ce stade. Si l'on interrompt à temps l'intoxication, les animaux ne se remettent qu'après une à deux heures, mais ne conservent aucune séquelle.

Il existe une concentration seuil, de l'ordre de 15 à 20 mg. de vapeur par litre d'air, au-dessous de laquelle l'animal ne présente aucune réaction anormale. Si l'on dépasse ce seuil, on voit

apparaître, après une phase d'irritation, des symptômes nerveux, tremblements, salivation, vertiges, crampes musculaires puis le décubitus, bientôt suivi de narcose légère.

Il existe également une concentration seuil pour la narcose profonde qui se continue par le coma et la mort par arrêt respiratoire.

Les différentes phases du tableau clinique se succèdent d'autant plus rapidement que les doses de toxique utilisées sont plus élevées ; 45 à 60 mg. par litre déterminent la mort en une demi-heure, 100 à 120 mg. la provoquent en quelques minutes, rappelant les intoxications foudroyantes déjà signalées.

Pour K. B. LEHMANN [134], les doses ne conditionnent pas l'intensité des symptômes, mais seulement la rapidité de leur apparition.

Cet auteur, puis son élève O. BAMESREITER [7], ont déterminé les seuils des différentes phases de l'intoxication aiguë, en fonction de la concentration toxique et du temps.

Pour le Chat, la chute sur le côté se produit à la concentration de 22 mg. par litre, la narcose légère avec 28 mg., la narcose profonde avec 30 mg. ; avec 45 mg., les symptômes d'intoxications sont immédiats et l'animal meurt en 30 minutes.

En portant en abscisses les concentrations et en ordonnées le temps nécessaire pour amener l'animal à l'un des trois degrés précités, on obtient des courbes qui rappellent l'hyperbole.

Chez le Chien l'anesthésie a lieu à des concentrations analogues.

J. RAMBOUSEK [173] trouve, sur le Lapin, des résultats identiques, la dose nocive étant de 15 mg. par litre et la mort ayant lieu en 30 minutes, avec 50 mg..

M. PÉRONNET [169] reproduit ces symptômes d'intoxication aiguë, sur des Cobayes, par inhalation d'une dose de 50 mg. par litre et constate qu'ils se produisent lorsque les concentrations dans le sang atteignent 2 mg., 6 à 2 mg., 8 de benzène pour 100 grammes.

Sur le Rat, le seuil de l'intoxication est situé, d'après J. BATCHELOR [9], entre 3 et 7 mg., ces doses ne produisant que des effets d'irritation, sans narcose ; par contre, nous avons trouvé que la dose de 20 mg., prolongée plusieurs heures, provoquait la mort de l'animal.

Sur la Souris, N. W. LAZAREW [124] a vu que la concentration minima de vapeurs, provoquant la chute sur le côté, était de 15 mg. par litre, la dose de 45 mg. provoquant la mort en deux heures.

Dans nos recherches, les intoxications aiguës que nous avons effectuées, sur des Chiens et des Cobayes, appartenaient à deux types, type suraigu, en employant la dose de 50 mg. qui provoque la mort de l'animal en 30 minutes environ avec narcose, type subaigu, avec une dose provoquant la narcose légère longtemps prolongée.

Nous n'avons donné, jusqu'ici, que les doses de benzène réalisant des intoxications aiguës par inhalation, nous signalerons simplement que la dose mortelle, par voie sous-cutanée, est, chez le Lapin, d'après A. PAPPENHEIM [164], de 5 cm³ par kilog.

Chez le Rat, la dose mortelle est, pour J. J. BATCHELOR [9], de 1 cm³, 25 à 2 cm³ par kilog par voie sous-cutanée, et de 2 cm³ par kilog, par voie intrapéritonéale.

INTOXICATIONS CHRONIQUES.

Nous définirons l'intoxication chronique par les vapeurs de benzène, celle qui se produit après un séjour prolongé dans des atmosphères de concentration telle qu'elles ne provoquent aucun effet toxique apparent, même après plusieurs heures.

Les intoxications chroniques expérimentales ont été principalement réalisées par voie sous-cutanée. L. SELLING [186] administrait quotidiennement, par kilog d'animal, 1 cm³ de benzène mélangé à son volume d'huile d'olive. Les accidents apparaissent en quelques jours. Chez le Lapin, la mort est provoquée par 5 à 10 doses semblables. La leucopénie peut être produite, sur le même animal, avec des doses plus faibles, longtemps prolongées, comme l'ont montré N. M. NIKOLAJEW et L. A. SCHPARO [157] qui trouvent, par contre, les Cobayes très résistants à l'intoxication. G. FONTANA [69] avait cependant pu réaliser, sur ces animaux, la leucopénie par la technique de L. SELLING [186].

Le Rat, d'après L. HEKTOEN [96], nécessiterait, pour l'obtention de la leucopénie, des doses plus élevées, en valeur relative, que le Lapin. J. J. BATCHELOR [9] provoque la leucopénie chez le Rat, avec une dose de 1 cm³ par kilogramme d'animal administrée quotidiennement pendant 13 jours.

Nous désirions réaliser nos intoxications chroniques en utilisant la voie respiratoire. Or, les chiffres donnés pour cette voie d'introduction sont peu nombreux. J. J. BATCHELOR [9] utilise la dose de 1 mg., 5 par litre d'air pour obtenir des accidents chroniques, par inhalation quotidienne, 18 à 20 heures pendant 7 jours. C. P. MAC CORD [145], avec des doses comparables, administrées sept heures par jour, est obligé de poursuivre, chez le Lapin, l'intoxication pendant plusieurs mois. La détermination de la dose efficace est délicate pour deux raisons, tout d'abord, il est difficile d'obtenir, par ce mode d'absorption, des accidents chroniques chez divers animaux et, tout particulièrement, chez le Chien, ensuite, les doses à utiliser sont extrêmement variables et dépendent de la durée d'exposition et de la susceptibilité individuelle.

En clinique humaine, on retrouve des faits comparables. Les doses provoquant l'intoxication aiguë sont bien connues. L'ingestion de 9 à 12 g., d'après L. LEWIN [139], provoque rapidement la mort. Par inhalation K. B. LEHMANN [133] et ses collaborateurs, expérimentant sur eux-mêmes, montrent que des concentrations de 10 mg. par litre provoquent des malaises, 15 mg. déterminent, en trente minutes, de la confusion mentale et 20 à 30 mg. provoquent la perte de connaissance. On admet généralement que la dose de 65 mg. par litre est mortelle, en 5 à 10 minutes. Mais, pour l'intoxication chronique, les doses ne sont pas rigoureusement établies, on suppose seulement que 0 mg., 1 par litre peut déjà, au bout d'un temps assez long, provoquer des accidents chroniques. Chez l'animal cette dose est trop faible et, ne donne aucun résultat même prolongée très longtemps.

Nous avons résolu de choisir, pour nos expériences, la dose maximum, ne provoquant, chez nos animaux, aucune manifestation visible d'intoxication (salivation et tremblements). Cette

dose était déterminée par tâtonnements, dans les premiers jours de l'expérience.

Il n'est pas souhaitable, en effet, d'amener l'animal jusqu'au tremblement qui occasionne des modifications sanguines, telles que l'hyperglycémie, qui témoignent d'un déséquilibre fonctionnel, non pathognomonique de l'intoxication benzénique. Nous n'avons pas prolongé les périodes d'inhalation au-delà d'une certaine durée journalière, afin de laisser aux animaux le temps de s'alimenter et de reposer dans des conditions normales.

Les doses utilisées ont varié, pour les Chiens, de 16 mg., 6 à 19 mg., 7 par litre, la durée d'exposition quotidienne s'échelonnant de 2 à 8 heures suivant les animaux. La dose utilisée, pour les Lapins et les Cobayes, était de 17 mg. par litre, pendant 4 puis 8 heures par jour. Les Rats étaient placés pendant 12 heures dans une atmosphère titrant 5 puis 10 mg. de benzène par litre.

Les intoxications effectuées dans ces conditions ont été prolongées pendant d'assez longues périodes, allant, dans un cas, jusqu'à 7 mois. L'animal ne manifestait aucun symptôme d'intoxication aiguë, mais montrait, au bout d'un temps variable, une atteinte profonde caractéristique de l'intoxication chronique.

CHAPITRE VI

TECHNIQUES HÉMATOLOGIQUES ET CHIMIQUES UTILISÉES

Le benzène étant un poison du sang nous avons suivi, sur nos animaux d'expérience, les phases de l'intoxication par de fréquents examens hématologiques effectués parallèlement avec les dosages chimiques. Dans la plupart des cas, nous avons également procédé à l'examen des urines, sur les Chiens en particulier. Afin d'éviter des modifications sanguines d'origine digestive, tous les prélèvements en vue des examens hématologiques ou chimiques étaient effectués le matin, sur des animaux à jeun depuis douze heures au moins.

1. — EXAMENS HÉMATOLOGIQUES

Nous avons effectué les examens hématologiques suivants :

- temps de saignement,
- temps de coagulation,
- numération des hématies et des leucocytes,
- établissement de la formule leucocytaire,
- taux d'hémoglobine à l'échelle de TALLQVIST,
- vitesse de sédimentation globulaire.

Chez le Chien et chez le Lapin, les quelques gouttes de sang nécessaires à ces examens étaient prélevées par incision, au vaccinostyle, d'une veinule auriculaire ; pour la détermination de la vitesse de sédimentation, les 2 cm³ de sang nécessaires sont prélevés à la saphène du Chien et au cœur, pour le Lapin. Chez le Cobaye et chez le Rat, les prélèvements sont effectués à la saphène externe.

Les différents examens ont été effectués selon les techniques classiques que nous nous bornerons à rappeler brièvement.

Pour la numération globulaire, le sang est prélevé à l'aide du mélangeur de POTAIN et dilué au $1/200^e$ dans le liquide de MARCANO, pour les hématies, et au $1/10^e$ dans l'eau acétique à 1 p. 100, colorée au bleu de méthylène, pour les leucocytes.

La numération est effectuée à l'aide de l'hématimètre de MALASSEZ. Nous faisons toujours, pour les hématies, la numération des éléments de 3 rectangles, correspondant chacun à un centième de millimètre cube et nous comptons les leucocytes de 50 de ces rectangles.

Les résultats expriment le nombre d'éléments (hématies ou leucocytes), par millimètre cube de sang.

Pour l'établissement de la formule leucocytaire, les étalements de sang, sont fixés et colorés par le procédé de MAY GRUNWALD-GIEMSA.

Le temps de saignement est établi par incision d'une veinule auriculaire, la gouttelette de sang s'écoulant est aspirée, toutes les trente secondes, à l'aide d'un papier buvard, jusqu'à l'arrêt spontané de l'écoulement. Le temps de saignement normal est de 2 à 3 minutes.

Le temps de coagulation est déterminé par le procédé de la lame couverte. On observe la déformation d'une grosse goutte de sang déposée sur une lame de verre et protégée de l'évaporation par un petit cristalliseur. La coagulation est terminée lorsque la gouttelette ne se déforme plus sensiblement par inclinaison de la lame. La coagulation nécessite normalement 6 à 7 minutes.

La mesure du temps de sédimentation des hématies a été effectuée par la méthode de WESTERGREN, modifiée par J. FORESTIER [71].

Le sang est prélevé à l'aide d'une seringue graduée spéciale, dans laquelle on a préalablement aspiré 0 cm^3 , 4 d'une solution anticoagulante de citrate de soude à 5 p. 100. On prélève

exactement 1 cm³, 6 de sang, de manière à obtenir 2 cm³ de liquide au total. Le sang citraté est mis dans un tube et agité soigneusement. On l'aspire dans des tubes de verre dits de WESTERGREN, longs de 30 cm. et larges de 2 mm., 5, ouverts aux deux extrémités et portant un trait de repère situé exactement à 20 mm. de l'extrémité inférieure. Le sang prélevé est amené exactement au trait de repère, les tubes sont bouchés aux deux extrémités et maintenus verticalement à l'aide d'un statif spécial.

Après une heure de repos, on mesure, au moyen d'une réglette métallique, le nombre de millimètres qui séparent le niveau supérieur du culot globulaire, du niveau primitif de la colonne liquide. Ce nombre exprime ce que l'on est convenu d'appeler le temps de sédimentation. On répète cette mesure après deux heures et après 24 heures.

Les chiffres normaux sont, pour le Lapin, 1 à 2 après une heure et 10 à 15 après 24 heures. Ils sont un peu plus faibles pour le Chien.

II. — EXAMENS CHIMIQUES DU SANG

Pour les dosages chimiques, les prises de sang sont effectuées de la manière suivante :

sur le Chien, prélèvement de 100 cm³, par ponction de la veine jugulaire externe ;

sur le Lapin, 20 cm³ sont prélevés par ponction cardiaque ;

sur le Rat, on obtiendra 5 cm³ de sang environ, par section des carotides.

Le sang est recueilli dans des récipients, soigneusement nettoyés au mélange chromique et rincés à l'eau bi-distillée.

Les dosages suivants ont été effectués sur chaque prise de sang :
— sur le sérum : dosages de l'urée, du cholestérol, des lipides, du calcium et détermination du rapport sérine/globuline ;

— sur le sang total : dosage du fer et du glucose.

Nous avons également déterminé, à la fois sur le plasma et sur le sang total, les taux de chlore, de potassium et de sodium. La teneur des globules en ces différents éléments était obtenue par le calcul.

Enfin le phosphore minéral a été dosé sur le plasma fluoré.

Ces dosages ont été effectués selon les techniques classiques bien établies, certaines cependant, d'un maniement délicat, ont nécessité de notre part, une étude préalable parfois longue.

Le sang obtenu au cours des prélèvements était traité différemment selon les cas.

Pour l'obtention du sérum, le sang est recueilli dans des tubes à centrifuger, puis laissé une heure, à la température du laboratoire, pour que s'opère la coagulation. Le sérum est alors séparé par centrifugation.

Dans les cas où nous devons opérer sur le plasma ou le sang total, nous avons rejeté l'emploi des anticoagulants salins qui modifient la répartition initiale de certains éléments entre plasma et globules, sauf pour la glycémie et la phosphatémie où l'utilisation de fluorure est indispensable pour inhiber l'action des diastases,

Nous ne disposions pas d'hirudine et nous n'avons pu pratiquer, d'une façon courante, en raison des difficultés de prélèvement sur l'animal, le procédé préconisé par Ch.-O. GUILLAUMIN [83] : prélèvement du sang dans un tube gradué bien sec, refroidi, centrifugation immédiate, décantation du plasma et prélèvement des globules à l'aide d'une pipette de GUILLAUMIN, avant toute coagulation.

Nous avons donc dû adopter une technique déjà utilisée au laboratoire pour des recherches analogues : la défibrination, par agitation modérée avec des perles de verre, le sang étant ensuite passé sur une gaze. Une portion est rapidement versée dans un ou plusieurs tubes à centrifuger, d'une contenance de 10 cm³, gradués à 1/10 cm³, on centrifuge 5 minutes à 5.000 tours et on note le volume total et celui du culot globulaire. On détermine ainsi, avec une précision de 2 p. 100, le volume globulaire ou rapport entre le volume occupé par les globules et le volume occupé par le plasma.

Les dosages sont effectués sur le sang total et sur le plasma, le taux des divers éléments des globules étant déduit par le calcul.

Tous les résultats sont exprimés en grammes par litre, du

constituant ou de l'élément dosé, sauf pour le fer où il est exprimé en grammes pour 1.000 g. de sang.

La plupart des techniques utilisées sont trop connues pour que nous jugions utile de les détailler. Nous nous contenterons donc de les indiquer, on trouvera les détails opératoires dans les Fiches de Chimie biologique de P. FLEURY [64]. Nous développerons les techniques qui sont moins connues ou qui auraient fait l'objet d'observations personnelles.

A. EXAMENS PRATIQUÉS SUR LE SÉRUM.

1° Dosage de l'urée.

Nous avons utilisé la méthode gazométrique à l'hypobromite de sodium.

2° Dosage du cholestérol total.

Nous avons choisi la méthode de GRIGAUT.

Le cholestérol, libéré par saponification à l'aide d'alcool sodé, est extrait par l'éther. Après évaporation de celui-ci et reprise par le chloroforme, il est évalué colorimétriquement par la réaction de LIEBERMANN.

3° Dosage du calcium.

Nous avons opéré selon la technique de Ch.-O. GUILLAUMIN [84]. Le calcium est séparé à l'état d'oxalate, dans le sérum préalablement minéralisé. L'acide oxalique lié au calcium est dosé par manganimétrie. On en déduit le calcium.

4° Dosage des protides totaux et détermination du rapport sérine/globuline.

Nous avons utilisé la méthode de A. ADNOT [3], [149] qui a l'avantage d'être très rapide et de n'exiger que 2 cm³ de sérum.

L'opération s'effectue dans deux tubes à centrifugation, tarés, où 1 cm³ de sérum est précipité par l'acétone, celle-ci étant ensuite

séparée par centrifugation. Le précipité est remis en solution dans l'eau salée et on effectue une nouvelle précipitation des protides, par l'acétone. Ces opérations ont pour but de détruire le complexe lipido-protidique et d'éliminer les lipides ainsi que la majeure partie des électrolytes. Une dernière centrifugation permet, après dessiccation, la pesée, dans l'un des tubes, des protides totaux. Dans l'autre tube, dont le contenu est redissous dans l'eau bi-distillée, les globulines sont précipitées, de la solution de protides délipidés, par un courant de gaz carbonique, amenant automatiquement la solution à pH 5,5. On pèse après dessiccation. La sérine est obtenue par différence. Cette technique, nous a donné des résultats identiques à celle de F. KAYSER [112]. Elle présente toutefois l'inconvénient de n'être pas valable dans tous les cas ; c'est ainsi que dans certains sérums, où les globulines sont particulièrement labiles, les protides ne sont pas précipitables par l'anhydride carbonique, même après repos de 24 heures. Ce cas s'est produit chez certains Lapins et chez deux Chiens soumis à l'intoxication chronique.

5^o Dosage des polypeptides.

Désirant effectuer, au cours de nos recherches, le dosage des polypeptides du sérum, nous avons utilisé une méthode mise au point, dans le service de M. le Professeur René FABRE, par notre collègue Yves RAOUL.

Dans la méthode d'ADNOT, les liqueurs acétoniques, utilisées pour la précipitation des protides, entraînent tout l'azote non protéique correspondant à l'urée, à l'acide urique, à la créatinine, aux polypeptides, ainsi qu'aux acides aminés et à l'ammoniaque du sérum sanguin. Ce taux d'azote non protéique sera facilement déterminé, par une kjeldahlisation du résidu de l'évaporation des liqueurs acétoniques, suivie d'une distillation, dans l'appareil de PREGL, de l'ammoniaque formée aux dépens de cet azote.

De ce chiffre ainsi déterminé, il suffit de soustraire l'azote de l'urée, déterminé gazométriquement, pour obtenir une fraction d'azote qu'on peut considérer comme correspondant à l'azote polypeptidique.

La minéralisation du résidu se fait par 5 cm³ d'acide sulfurique pur ajoutés, par petites fractions, sur l'extrait à détruire, afin de l'entraîner en totalité dans le micro-kjeldahl ; une trace de sulfate de cuivre sert de catalyseur. L'ammoniaque distillée est dosée en présence d'alizarine par l'acide sulfurique N/100 dont 1 cm³ correspond à 0 g., 00014 d'azote. Le taux de l'azote polypeptidique du sérum du Chien est normalement de 0 g., 15 à 0 g., 20 par litre.

6° Dosage des lipides totaux.

Ce dosage a été effectué selon la technique de A. GRIGAUT, A. BOUTROUX et A. CODOUNIS [82], dont le principe est le suivant : les protides du sérum sont précipités par 5 parties d'alcool à 95° et le coagulum est soumis à l'épuisement continu par l'alcool, pendant 6 heures, dans un appareil de KUMAGAWA et SUTO.

Les filtrats alcoolistiques et les liqueurs provenant de cet épuisement sont réunis. Ils contiennent la totalité des lipides de l'échantillon. Après distillation de l'alcool, sous vide, le résidu est repris par l'éther, qui laisse insoluble les lécithines.

Cet éther filtré est recueilli dans un cristalliseur taré, et évaporé à basse température. Le résidu, desséché pendant 5 heures à la température de 50° et pesé, donne le taux des lipides de l'échantillon. La pesée du coagulum protidique, recueilli lors de sa précipitation sur deux filtres équilibrés, permet de vérifier le chiffre des protides totaux obtenu par la méthode d'ADNOT.

7° Recherche des pigments biliaires.

Nous avons utilisé la méthode de FOUCHET [64].

Sous l'action combinée d'un agent coagulant et d'un oxydant (acide trichloracétique et perchlorure de fer), le coagulum protidique du sérum, prend une coloration verdâtre plus ou moins intense, due à la biliverdine produite.

En comparant la teinte obtenue avec des sérums témoins, contenant une quantité connue de bilirubine, on peut faire un dosage approximatif.

Cette méthode permet d'apprécier une teneur en bilirubine de 1 p. 60.000.

B. — EXAMEN EFFECTUÉ SUR LE PLASMA FLUORÉ.

Dosage du phosphore minéral.

Nous avons adopté la technique de A. P. BRIGGS [21], modification de la méthode de BELL et DOISY.

Le dosage s'effectue après défécation trichloracétique.

Son principe est le suivant :

On forme un phosphomolybdate qui, sous l'action de réducteurs (sulfite de soude et hydroquinone), donne une coloration bleue stable. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de phosphore mise en jeu et peut être comparée avec celle d'un étalon.

C. — EXAMENS PRATIQUÉS SUR LE SANG TOTAL FLUORÉ.

1^o Détermination de la glycémie.

Le sucre sanguin a été dosé par la méthode de BAUDOUIN et LEWIN, selon la technique indiquée par P. FLEURY et J. MARQUE [65].

Le sang est déféqué par le nitrate mercurique dont l'excès est éliminé par alcalinisation. Le filtrat, additionné d'une solution alcaline d'iodomercurate, est porté 3 minutes au bain-marie bouillant. Le mercure métallique, provenant de la réduction du réactif par le sucre sanguin, est dosé par dissolution, en milieu acide, dans une solution titrée d'iode, ajoutée en excès. Cet excès est dosé en retour, par l'hyposulfite de sodium.

2^o Dosage du fer.

Nous avons adopté la technique de P. FLEURY et J. MARQUE [66]. Le sang est incinéré en présence d'une petite quantité de nitrate de magnésium. Les cendres sont dissoutes dans l'acide chlorhydrique concentré. La solution ferrique obtenue est réduite à l'état ferreux par le mercure et la solution ferreuse est titrée au permanganate en présence de réactif phosphomolybdique qui donne, avec les sels ferreux, une coloration bleue. Nous avons exprimé le résultat en grammes de fer pour 1.000 grammes de sang. Le chiffre obtenu multiplié par 26,3 donne la teneur en hémoglobine pour cent.

D. — EXAMENS PRATIQUÉS SUR LE PLASMA ET LE SANG TOTAL.

1^o Dosage du chlore.

Nous avons employé le procédé LAUDAT, en suivant la technique de Max LÉVY [137]. La destruction se fait en présence d'un excès de solution titrée de nitrate d'argent à chaud, par l'acide nitrique et le permanganate. Dans ces conditions, les matières organiques sont suffisamment décomposées pour ne pas s'opposer à la précipitation complète du chlorure d'argent, tandis que l'argent bloque intégralement le chlore. On dose l'excès de nitrate d'argent non combiné suivant la technique de CHARPENTIER-VOLHARDT.

2^o Dosage du sodium.

Nous avons adopté la méthode de E. KAHANE [110], modifiée par M. M. PACU [163], qui, au lieu d'effectuer la pesée du complexe sodico-urano-magnésien sur creuset de GOOCH taré, réalise la précipitation et les lavages dans un tube à centrifuger taré où se fait la pesée finale. Cette technique, essayée sur des solutions titrées, nous a donné des résultats satisfaisants, l'erreur ne dépassant pas 2 p. 100. Nous avons effectué le dosage du sodium dans les globules par la méthode indirecte, procédé qui, dans ce cas, donne des résultats incertains, la faible teneur en sodium des globules sanguins augmentant les causes d'erreur. Nous nous contenterons donc, dans ce cas, d'indiquer simplement le sens des variations observées.

3^o Dosage du potassium.

Nous avons utilisé la méthode de H. GRIFFON [81], appliquée au sang par A. LEULIER, L. VELLUZ et H. GRIFFON [136].

Le principe de la méthode est le suivant :

Le potassium est précipité, en milieu acétique, à l'état de cobaltinitrite insoluble. Le précipité, séparé et lavé, est hydrolysé à chaud par le phosphate disodique. Le cobalt passe à l'état de phosphate et les groupements NO_2 à l'état de nitrites alcalins.

Ceux-ci sont oxydés par un excès de permanganate, en milieu sulfurique à froid. Cet excès est ensuite déterminé iodométriquement. Cette technique, appliquée à des solutions titrées, nous a permis de doser le potassium avec une précision de ± 3 p. 100.

Pratiquement, le plasma est déféqué par addition d'un volume égal d'acide trichloracétique. Après centrifugation, le liquide neutralisé par le carbonate de lithium pur, est prêt pour le dosage.

Pour le sang total les auteurs préconisent la destruction sulfoperchlorique. Elle a l'inconvénient de nécessiter, pour la neutralisation de l'acide sulfurique résiduel, une assez grande quantité de carbonate de lithium. La formation de cobaltinitrite se fera en présence du grand excès de sel neutre ainsi formé, ce qui modifie les conditions de la précipitation. Pour remédier à cet inconvénient, nous avons utilisé la défécation du sang total, selon le mode opératoire préconisé par Ch.-O. GUILLAUMIN [83].

Le sang total est dilué dans 7 volumes d'eau bi-distillée qui servent également au rinçage de la pipette. L'hémolyse étant totale, on ajoute 2 volumes de solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100. Après mélange et centrifugation, on obtient un liquide limpide, incolore, désalbuminé. Le dosage s'effectue sur une portion aliquote (généralement 10 cm³ correspondant à 1 cm³ de sang), suivant la technique des auteurs, après neutralisation de l'acide par le carbonate de lithium exempt de potassium et élimination des sels ammoniacaux par l'acide nitreux. L'erreur due au volume occupé par le précipité est, dans ces conditions, relativement faible et peut être négligée.

III. — EXAMEN DES URINES

Dans les urines de la plupart des Chiens, soumis à l'intoxication benzénique, nous avons effectué les recherches suivantes :

— Recherche de l'albumine, du glucose, des corps cétoniques, des pigments, des acides biliaires et des phénols.

— Recherche du sang.

— Dosage des chlorures.

Pour ces examens, nous avons suivi les méthodes classiques que nous indiquerons brièvement.

1^o Recherche de l'albumine.

L'albumine est coagulée par la chaleur au voisinage de son point isoélectrique, en présence de sel neutre.

2^o Recherche du glucose.

Cette recherche a été effectuée par réduction de la liqueur cupro-alcaline, à l'ébullition.

3^o Recherche des corps cétoniques.

La présence de corps cétoniques a été recherchée par la réaction de LEGAL, au nitroprussiate de sodium acétique, effectuée sur l'urine préalablement déféquée par l'acétate basique de plomb, selon la technique habituelle.

4^o Recherche des pigments et des acides biliaires.

Nous avons suivi le procédé de GRIMBERT. La biliburine est entraînée dans un précipité de phosphate barytique. On transforme le pigment adsorbé sur le précipité, en biliverdine, par oxydation au moyen de l'alcool chlorhydrique à chaud.

Les acides biliaires ont été recherchés à l'aide de la réaction au soufre, dite de HAY, basée sur les modifications de la tension superficielle de l'urine.

5^o Recherche des phénols dans l'urine.

L'urine, préalablement acidifiée par l'acide phosphorique, est soumise à la distillation. Dans les premières portions, on effectue les réactions classiques des phénols : précipitation par l'eau de brome, réaction de MILLON.

6° Recherche du sang dans l'urine.

Nous avons suivi la technique de POIROT-LAMBERT qui repose sur les propriétés peroxydasiques du pigment sanguin ou de son dérivé, l'hématine.

7° Dosage des chlorures.

Nous avons utilisé la méthode de CHARPENTIER-VOLHARDT.

*
* *

CHAPITRE VII

INTOXICATIONS AIGÜES

Parmi les accidents dus au benzène, les intoxications aiguës présentent beaucoup moins d'intérêt que les intoxications chroniques car elles peuvent être plus facilement évitées dans la pratique. Lorsqu'elles se produisent, elles sont accidentelles : rupture d'une conduite, nettoyage d'une cuve d'où le benzène n'est pas complètement éliminé ; c'est dire qu'elles sont relativement rares. Nous avons voulu les étudier malgré tout et nous avons considéré les deux formes sous lesquelles elles peuvent se présenter.

1^o Intoxication suraiguë où le benzène est administré à une concentration suffisante pour que la mort survienne rapidement.

2^o Intoxication subaiguë, la dose est suffisante pour entretenir la narcose sans tuer l'animal.

Qu'il s'agisse d'intoxication aiguë ou chronique, nous avons, dans tous les cas, étudié les variations de la composition chimique et des éléments figurés du sang. A la mort de l'animal, nous avons, après autopsie, effectué le dosage du toxique dans les différents organes.

1^o INTOXICATIONS SURAIGÜES

Cette intoxication a été réalisée uniquement sur le Chien, un premier prélèvement de sang, donnant les chiffres témoins a été effectué avant l'intoxication, un second étant fait immédiatement à la mort de l'animal.

CHIEN 1.

Nous avons opéré sur une Chienne de quatre à cinq ans, pesant 12 kg. 800, qui avait subi, à son arrivée au laboratoire le traitement antiparasitaire habituel.

Nous l'avons gardée en observation quelques jours. Sa formule sanguine était normale ainsi que sa courbe de poids.

L'intoxication a été effectuée, dans la cage respiratoire, avec un débit d'air toxique de 1.200 litres heure. La concentration en benzène était de 50 mg. par litre. La température pendant l'expérience a oscillé entre 20° et 23°.

Dès la seconde minute, l'animal est pris d'un tremblement régulier, coupé d'accès d'agitation désordonnée. A la 7^e minute, on observe la chute sur le côté, le Chien a les pattes raidies, sa respiration est profonde. De temps à autre, au cours de la narcose, on note de violentes crises convulsives, puis l'animal retombe en hyperextension, la tête en arrière.

Après 37 minutes d'intoxication, la mort survient par arrêt respiratoire dû à la sidération du bulbe. L'animal, immédiatement sorti de la cage, est saigné par ponction cardiaque. L'autopsie est pratiquée. On perçoit une nette odeur de benzène. Le sang est noir, la graisse grisâtre. Le poumon est hémorragique, certains lobes présentant une hépatisation grise. Le foie est normal, la rate plus violacée et les surrénales plus jaunes que de coutume.

Les dosages effectués dans le sang avant et après intoxication, ont donné les résultats consignés dans le tableau N° VIII.

TABLEAU N° VIII

INTOXICATIONS SURAIGÜES

Variations du taux de quelques constituants chimiques du sang, chez le Chien

Chien I

	AVANT L'INTOXICATION	A LA MORT DE L'ANIMAL
Volume globulaire.....	0,79	0,56
Urée.....	0,44	0,61
Glucose.....	0,59	0,66
Cholestérol.....	2,93	2,70
Lipides totaux.....	16,19	15,60
Protides totaux.....	73,5	67,2
Sérine.....	38,5	37,1
Globuline.....	35	30,1
Rapport $\frac{\text{sérine}}{\text{globuline}}$	1,1	1,23
Chlore globulaire.....	1,63	2,05
Chlore plasmatique.....	4,18	3,97
Rapport $\frac{\text{chlore globulaire}}{\text{chlore plasmatique}}$	0,39	0,51
Calcium.....	0,098	0,108

Les résultats sont exprimés en grammes par litre.

L'examen de ces chiffres ne montre pas de modifications importantes des constituants chimiques du sang pouvant être attribuées à l'intoxication benzénique. L'augmentation de l'urée n'est pas spécifique en elle-même, ni l'hyperglycémie que les auteurs rapportent aux mouvements involontaires de l'animal.

Une légère diminution du cholestérol et des lipides est constatée ainsi qu'une augmentation de la calcémie. Il ne faut attacher à ces résultats qu'une importance relative. Si l'étude des constituants du sang est primordiale dans les intoxications prolongées, où elle peut renseigner sur le mécanisme de l'empoisonnement, elle perd de son intérêt lorsque la mort est aussi rapide.

2° INTOXICATIONS SUBAIGUËS

Nous avons utilisé, pour ces expériences, d'une part le Cobaye, d'autre part le Chien.

COBAYES.

Deux Cobayes pesant respectivement 575 g. et 590 g., sont saignés en vue du dosage de quelques constituants chimiques de leur sérum sanguin. Plusieurs jours après, on détermine leur formule sanguine et on leur fait subir une intoxication subaiguë par voie respiratoire.

Le débit de l'atmosphère toxique était de 1.200 litres heure et la concentration en benzène de 31 mg. par litre. Très rapidement, les animaux semblent incommodés et tombent sur le côté. La narcose apparaît et se poursuit, coupée de tremblements. Elle n'est d'ailleurs pas très profonde, la plupart des réflexes étant conservés.

Le premier Cobaye est sorti de la cage après 3 h. 10 et le second après 3 h. 40, ils subissent les mêmes prélèvements de sang qu'avant l'intoxication et sont sacrifiés. L'autopsie n'a révélé aucune lésion caractéristique. A part l'hyperleucocytose nette constatée et qu'on peut rattacher à l'intoxication benzénique, il est difficile de tirer une conclusion quelconque des chiffres indiqués dans le tableau N° IX. Aussi avons-nous repris cette expérience sur le Chien.

TABLEAU N° IX

INTOXICATIONS SUBAIGUËS

Modifications de la composition du sang chez le Cobaye

	COBAYE I		COBAYE II	
	Avant l'intoxication	Après l'intoxication	Avant l'intoxication	Après l'intoxication
Glucose.....	0,89	1,40	1,07	0,61
Cholestérol.....	0,19	0,21	—	0,46
Protides totaux.....	60,3	58,7	55,7	58,3
Sérine.....	41,4	36,7	29,9	40,5
Globuline.....	18,9	22	25,8	18,2
Rapport $\frac{\text{sérine}}{\text{globuline}}$	2,19	1,67	1,16	2,22
Taux des hématies par mm ³ de sang.....	4.786.000	4.540.000	4.530.000	4.765.000
Taux des leucocytes par mm ³ de sang.....	16.500	21.460	9.650	22.380

Les résultats des dosages sont exprimés en grammes par litre.

CHIEN II.

Un Chien mâle de neuf à dix ans, bien portant, pesant 11 kg., 900 a été saigné, afin d'effectuer le dosage des principaux constituants chimiques du sang. Quinze jours après, nous déterminons sa formule sanguine et prenons sa température rectale qui est alors de 40°. L'animal est introduit ensuite dans la chambre à gaz où le débit d'air toxique est de 1.200 litres heure, avec une concentration en benzène de 26 mg. par litre.

Pendant la première heure, l'animal ne réagit pas et ne paraît pas très incommodé. Cependant, dès la deuxième heure, il s'agite et est pris de tremblements avec perte d'équilibre et salivation. Après 2 h. 10 d'intoxication, il tombe sur le côté, présentant une narcose avec conservation du réflexe oculo-palpébral.

Cette narcose se prolonge jusqu'à ce que l'on sacrifie l'animal, après une durée totale d'intoxication de neuf heures.

Avant la mort on a noté à nouveau la température rectale qui est à ce moment de 41°5, déterminé la formule sanguine et effectué une prise de sang.

L'autopsie, pratiquée immédiatement, montre l'existence d'une hémorragie cérébrale ; le poumon est anthracoïde. Les autres organes sont normaux.

Des prélèvements sont faits en vue de rechercher la localisation du toxique.

Les résultats des déterminations hématologiques et des dosages chimiques sont notés dans les tableaux N^{os} X et XI.

Les polynucléaires éosinophiles n'ayant pas montré de modifications de leur taux en rapport avec l'intoxication, nous les avons groupés dans nos tableaux, pour plus de clarté, avec les neutrophiles sous la rubrique polymorphonucléaires.

TABLEAU N^o X

INTOXICATIONS SUBAIGÜES

Modifications de la formule sanguine, chez le Chien

Chien II

	AVANT L'INTOXICATION	APRÈS L'INTOXICATION
Hémoglobine p. 100	90	95
Hématies par mm ³	5.920.000	7.520.000
Leucocytes par mm ³	9.140	17.600
Polymorphonucléaires p. 100.....	90	98
Grands mononucléaires p. 100.....	—	2
Moyens mononucléaires p. 100.....	10	—

Au point de vue hématologique, on constate une polyglobulie sans modification correspondante du taux de l'hémoglobine et une hyperleucocytose, avec augmentation du nombre des granulocytes. L'examen de la formule sanguine a montré, en outre, la présence d'hématies nucléées (2 p. 100 des leucocytes).

TABLEAU N° XI

INTOXICATIONS SUBAIGUËS

Variations du taux de quelques constituants chimiques du sang,
chez le Chien.

Chien II

	AVANT L'INTOXICATION	APRÈS L'INTOXICATION
Volume globulaire.....	1,16	1,16
Urée.....	0,65	1,70
Glucose.....	0,60	0,93
Cholestérol.....	1,85	2,21
Lipides totaux.....	12,25	14,8
Protides totaux.....	75,6	78
Sérine.....	38,5	44,1
Globuline.....	37	33,9
Rapport $\frac{\text{sérine}}{\text{globuline}}$	1,04	1,3
Chlore globulaire.....	2,13	2,05
Chlore plasmatique.....	4,13	4,46
Rapport $\frac{\text{chlore globulaire}}{\text{chlore plasmatique}}$	0,51	0,46
Potassium globulaire.....	0,221	0,210
Potassium plasmatique.....	0,220	0,253
Calcium.....	0,095	0,099

Les résultats sont exprimés en grammes par litre.

L'urée sanguine et la glycémie sont très fortement augmentées.

Le cholestérol et les lipides totaux suivent la même ascension ainsi que le rapport sérine/globuline. On note de même une augmentation parallèle du chlore des globules et du plasma, sans modification du rapport. Le potassium globulaire tend à diminuer tandis que le potassium plasmatique s'élève, phénomène déjà signalé par R. FABRE [56] dans l'anesthésie par le chloroforme. Ces variations importantes peuvent ici être attribuées à l'effet prolongé du toxique qui, par son action dissolvante, mobilise les lipides et modifie l'équilibre érythro-plasmatique du sang.

CHAPITRE VIII

INTOXICATIONS CHRONIQUES

Les intoxications chroniques ont toutes été effectuées par voie respiratoire, mode d'administration jugé comme plus étroitement en rapport avec les conditions réalisées dans les diverses industries où l'on utilise le benzène.

Ces intoxications effectuées quotidiennement, pendant deux à douze heures, suivant les cas, ont été prolongées pendant des temps variant de 5 semaines à 7 mois.

L'inhalation du toxique se faisait dans la cage respiratoire. Nous avons toujours employé, au cours de ces expériences, la dose la plus forte, ne provoquant pas chez l'animal de manifestation extérieure d'intoxication (salivation, tremblements...). Cette dose était déterminée par tâtonnements dans les premiers jours de l'expérience.

Les concentrations en vapeurs nocives étaient vérifiées à chaque séance d'intoxication.

Les animaux étaient l'objet d'une surveillance constante. Des numérations globulaires hebdomadaires ou parfois plus rapprochées étaient effectuées, ainsi que des prises de sang régulièrement espacées (environ une par mois). Nous suivions ainsi constamment l'évolution de l'intoxication.

Nous avons effectué ces intoxications sur :

- 1^o le Chien
- 2^o le Lapin
- 3^o le Cobaye
- 4^o le Rat.

1^o INTOXICATIONS CHRONIQUES RÉALISÉES SUR LE CHIEN

Tous les Chiens qui ont servi dans ces expériences étaient, avant toute intoxication, conservés au laboratoire pendant un laps de temps d'un à deux mois, afin de les accoutumer à leurs nouvelles conditions de vie : température du local, régime alimentaire...

Nous pouvions nous assurer ainsi de leur bon état de santé, grâce à leur courbe de poids et vérifier la constance suffisante de leur formule sanguine, après un traitement antiparasitaire.

CHIEN III.

Un jeune fox blanc castré, très gras, pesant 10 kg., 500 est conservé deux mois en observation. Il subit le traitement antiparasitaire ; sa formule sanguine est normale et relativement constante. La prise de sang témoin effectuée montre une forte hypercholestérolémie à 4 g., 10, tous les autres éléments pouvant être considérés comme normaux. La composition de l'urine est normale, absence de glucose, d'albumine, d'acétone, de pus et de sang. La courbe de poids augmente régulièrement et atteint 12 kg., 900 le 1^{er} Février, jour où l'on commence l'expérience.

L'animal est intoxiqué deux heures par jour pendant 28 jours.

Le débit d'atmosphère toxique est de 1.200 litres à l'heure, la concentration moyenne en benzène, de 17 mg., 5. Dans ces conditions l'intoxication paraît, au début, bien supportée, mais dès le quatrième jour du traitement, l'animal est pris d'accès de vomissements qui persistent durant trois jours. Après une accalmie, ces vomissements réapparaissent les douzième et quatorzième jours. Pendant toute cette période, on note de l'inappétence et de la somnolence. La courbe de poids montre une chute importante et régulière. A partir du vingt-troisième jour, le Chien refuse toute nourriture et est dans un état de cachexie avancée. Il s'affaiblit progressivement et vomit de la bile. Devant cet état alarmant, le vingt-huitième jour on interrompt l'intoxication. A cette période, les ponctions de la jugulaire se montrent très difficiles et nous n'avons pu obtenir que quelques centimètres cubes de sang. L'animal meurt deux jours après, le 1^{er} Mars.

L'autopsie, pratiquée le lendemain, montre un panicule adipeux encore important. On note la dégénérescence graisseuse du foie, avec une vésicule énorme mais ne renfermant pas de calcul. Les poumons présentent une congestion des bases, le cœur renferme des masses de plasma coagulé. On trouve, en outre, de nombreux parasites que nous avons identifiés comme étant du *Dipylidium caninum* et du *Botriocephalus latus*.

Nous n'avons pu doser que quelques constituants chimiques du sang ; ces dosages n'ont fourni aucun résultat intéressant. Pendant l'intoxication, les urines émises prenaient à l'air une coloration noire, due à la présence de produits phénoliques provenant de l'oxydation du benzène dans l'organisme, phénomène que nous étudierons par ailleurs.

Dans les derniers jours, elles renfermaient 0 g., 05 d'albumine par litre.

Les résultats des examens hématologiques effectués avant et au cours de l'intoxication sont réunis dans le tableau N° XII.

TABLEAU N° XII

INTOXICATIONS CHRONIQUES

Numérations globulaires et formules leucocytaires

Chien III

	DATE	HÉMATIES	LEUCOCYTES	Poly-morpho-nucléaires p. 100	Grands mononucléaires p. 100	Moyens mononucléaires p. 100	Lymphocytes p. 100	Formes de transition p. 100
Avant l'intoxication	16/10	5.180.000	5.200	56	2	24	16	2
	30/10	5.770.000	6.800	64	»	18	18	»
	9/11	5.800.000	6.000	»	»	»	»	»
	20/12	5.540.000	6.050	»	»	»	»	»
	9/1	5.500.000	6.480	82	»	12	»	6
	16/1	5.600.000	6.260	70	1	27	»	2
	30/1	5.360.000	6.540	80	»	14	6	»
Au cours de l'intoxication	5/2	5.680.000	9.860	89	»	10	»	10
	6/2	5.890.000	6.720	56	3	33	»	8
	7/2	5.880.000	6.800	80	»	14	2	4
	12/2	5.960.000	5.250	»	»	»	»	»
	25/2	5.348.000	3.810	92	»	8	»	»
	26/2	5.120.000	6.060	»	»	»	»	»
	27/2	4.440.000	5.080	98	»	2	»	»

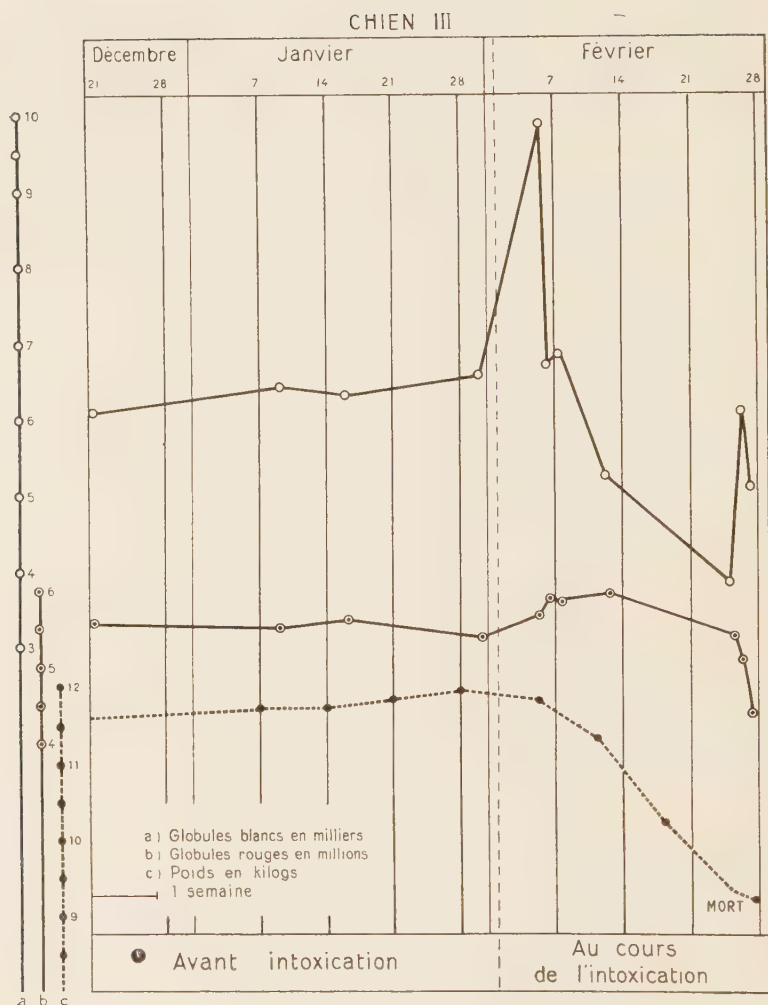


FIG. 9. — Variations du taux des éléments sanguins et du poids, au cours de l'intoxication chronique réalisée sur le chien.

L'examen de ce tableau montre que l'intoxication a provoqué une poussée d'hyperleucocytose avec mononucléose, suivie d'une chute du nombre des globules blancs jusqu'au taux relativement faible de 3.800.

Cette chute est accompagnée d'une diminution très nette du nombre des moyens mononucléaires, les polymorphonucléaires augmentant au contraire en valeur relative. L'anémie n'apparaît que dans les derniers jours.

Le Chien paraît donc bien avoir succombé à une intoxication benzénique qui, malgré la dose relativement faible, revêt ici le type subaigu plutôt que la forme chronique vraie.

CHIEN IV.

Un Chien mâle de huit ans environ, pesant 12 kg., 300, est mis en observation. Il présente une forte éosinophilie que nous n'avons pu faire regresser qu'en faisant subir, à deux reprises, à l'animal, un traitement antiparasitaire.

Il reçoit d'abord, pendant trois jours consécutifs, une dose de 1 g., 50 de poudre de semen-contra, puis, deux semaines après, devant la persistance de la réaction sanguine, nous lui administrons sept capsules de fougère mâle et calomel.

Sa formule sanguine devient alors normale et reste relativement constante, sa courbe de poids tend à monter.

Nous lui faisons une prise de sang, afin d'effectuer les dosages habituels. Les chiffres obtenus sont normaux. Dans ces conditions l'expérience peut être commencée.

Elle a duré 6 mois 1/2, du 22 janvier au 3 août, pendant lesquels le Chien a été placé quotidiennement dans la cage respiratoire, 2 heures par jour pendant les 6 premiers mois, puis 4 heures par jour dans la dernière quinzaine. Après ces 6 mois 1/2 d'intoxication, l'animal est laissé au repos afin d'étudier son comportement et l'évolution des modifications pathologiques provoquées par le benzène.

Le débit d'atmosphère toxique était de 1.200 litres heure, la concentration moyenne en benzène étant de 19 mg., 7 par litre. Cette dose a été déterminée par tâtonnements, dans les

premiers jours de l'expérience, une dose plus forte provoquant la salivation, le tremblement et la perte d'équilibre.

Nous avons étudié les variations de la température et de l'état hygrométrique de l'atmosphère de la cage, ainsi que sa teneur en oxygène et en anhydride carbonique. La température varie, au plus, de 1 à 2° au cours de l'expérience, l'état hygrométrique, normalement de 70 p. 100 d'humidité, passe en quelques minutes à 80 et se stabilise à ce taux.

Après deux heures d'intoxication, la teneur de l'air de la cage en anhydride carbonique était de 0,3 p. 100 et le taux de l'oxygène de 20,6 p. 100. L'animal se trouve donc à ces divers points de vue dans des conditions satisfaisantes.

Le Chien a très bien supporté l'intoxication. Il a toujours conservé son appétit. S'il a un peu maigri au cours du premier mois, son poids s'est ensuite maintenu constant. Quoique paraissant absolument normal, il subissait néanmoins l'action du toxique.

L'air expiré par l'animal présentait encore une nette odeur de benzène, plusieurs heures après la sortie de la cage. Les urines émises prenaient à l'air une couleur noirâtre due à la présence de dérivés phénoliques. Les résultats des examens hématologiques consignés dans le tableau N° XIII montrent l'apparition brusque, après 6 semaines d'intoxication, d'une hyperleucocytose très nette, le nombre des globules blancs passant de 10.000 à près de 18.000. Puis, ce taux subit de larges oscillations, assez régulières, dont la ligne générale est une descente. Après 6 mois 1/2, il est tombé aux environs de 4.000. C'est à ce moment que nous avons interrompu l'intoxication.

Ces oscillations ne sont pas en rapport avec les saignées effectuées, ainsi que nous l'avons vérifié. Elles ont d'ailleurs été décrites par H. DIMMEL [42], comme caractéristiques de l'intoxication benzénique. L'étude de la formule leucocytaire montre l'existence, avant toute intoxication, d'un taux très bas de lymphocytes ou petits mononucléaires. Au début, on note, aux dépens des moyens mononucléaires, une augmentation des formes de transition et des polymorphonucléaires dont le

TABEAU N° XIII
INTOXICATIONS CHRONIQUES
Numérations globulaires et formules leucocytaires
Chien IV

	DATE	HÉMATIES	LEUCO-CYTES	Poly-morpho-nucléaires p. 100	Grands mononucléaires p. 100	Moyens mononucléaires p. 100	Lym-pho-cytes p. 100	Formes de transition p. 100
Avant l'intoxication	20/12	6.600.000	8.400	90	»	8	»	»
	6/1	6.100.000	8.800	82	2	14	»	2
	9/1	6.140.000	8.100	80	»	10	10	»
	22/1	5.900.000	11.000	82	»	14	»	4
Au cours de l'intoxication	24/1	6.140.000	10.700	»	»	»	»	»
	27/1	6.460.000	9.400	94	»	6	»	»
	3/2	7.285.000	9.540	86	2	6	»	»
	10/2	6.760.000	9.080	94	2	2	»	»
	25/2	7.040.000	11.380	90	»	4	2	4
	3/3	6.520.000	»	88	»	8	»	3
	7/3	6.980.000	10.050	76	4	6	»	6
	11/3	7.980.000	17.400	92	»	»	»	»
	20/3	5.710.000	17.850	93	3	»	»	4
	9/4	6.440.000	16.400	96	»	4	»	»
	19/4	6.486.000	11.900	92	5	3	»	»
	24/4	6.285.000	12.480	83	1	7	1	8
	2/5	5.994.000	15.840	96	»	1	»	3
	11/5	5.880.000	11.960	88	1	5	1	5
	19/5	6.580.000	13.320	82	2	10	»	6
	22/5	6.220.000	15.520	86	6	6	»	2
	29/5	5.900.000	13.200	88	»	12	»	»
	6/6	5.800.000	9.000	82	6	8	»	4
	15/6	5.585.000	14.400	90	2	6	»	2
	20/6	6.526.000	15.200	»	»	»	»	»
	26/6	7.360.000	11.080	94	»	6	»	»
	6/7	6.806.000	17.400	82	»	18	»	»
	17/7	6.426.000	7.350	82	»	18	»	»
	23/7	6.140.000	14.940	80	10	10	»	»
	25/7	6.794.000	8.860	92	»	4	»	4
	28/7	»	12.200	84	»	10	»	6
	3/8	4.460.000	4.090	76	»	22	»	2
Après l'intoxication	14/9	7.120.000	8.360	84	»	16	»	»
	19/9	6.894.000	8.460	82	4	10	»	4

taux reste élevé pendant toute l'intoxication, sauf à la fin où la leucopénie est accompagnée d'une mononucléose.

Le nombre des érythrocytes ne se modifie pas sensiblement, on note cependant, vers les derniers jours de l'intoxication, une tendance à l'anémie en même temps qu'une modification de la sédimentation globulaire qui s'effectue alors trois fois plus rapidement qu'à la normale, ainsi que l'indique le tableau N° XIV.

TABLEAU N° XIV

Modifications de la sédimentation globulaire
à la fin de l'intoxication et après retour à la normale

DATE	SÉDIMENTATION GLOBULAIRE		
	1 Heure	2 Heures	24 Heures
9/7	2	3,5	10,6
24/7	5,6	11	27,5
19/9	1	2	9

Les temps de saignement et de coagulation ne présentent pas de modification nette.

Tous les mois, nous avons effectué, sur l'animal à jeun, une prise de sang de 100 cm³ par ponction de la jugulaire et nous avons dosé les principaux constituants chimiques du sang. Les résultats obtenus sont indiqués dans le tableau N° XV.

On peut interpréter ces résultats en distinguant trois phases dans l'intoxication. La première, au cours de laquelle a été effectuée la prise de sang faite, le 12 Mars, dès l'apparition de la leucocytose, montre qu'à ce moment la composition du sang n'a pas varié. Les chiffres seraient même plus proches de ceux que l'on donne habituellement comme normaux.

TABLEAU N° XV
INTOXICATIONS CHRONIQUES

Variations du taux de quelques constituants chimiques du sang chez le Chien
Chien IV

DÉTERMINATIONS EFFECTUÉES	Avant l'into- xication	AU COURS DE L'INTOXICATION						1 mois 1/2 après la fin de l'into- xication
		12/3	23/4	22/5	26/6	24/7	3/8	
Volume globulaire.	1,18	1,07	0,79	0,95	1,1	0,91	0,87	1,14
Urée	0,56	0,34	0,60	0,58	0,41	0,50	»	0,64
Glycémie	0,60	0,59	0,80	0,65	0,72	0,70	»	0,59
Cholestérol ...	1,85	1,68	1,90	2,63	2,17	2,34	2,80	1,80
Lipides totaux...	11,35	8,96	11	13,7	11,80	13,4	»	12
Protides totaux...	78,4	74	76,2	84	86,7	80,8	77	74,1
Sérine	41,9	40,7	31,7	»	»	29,7	32,9	37,8
Globuline	36,5	33,3	44,5	»	»	51,1	41,1	36,3
Rapport $\frac{\text{sérine}}{\text{globuline}}$...	1,16	1,22	0,71	»	»	0,58	0,74	1,04
Chlore globulaire ..	1,95	2,08	2,16	2,25	2,11	2,11	1,77	2,09
Chlore plasmatique.	4,54	4,33	4,22	4,12	4,10	4,18	4,43	4,05
Rapport: $\frac{\text{chlore globulaire}}{\text{chlore plasmatique}}$	0,43	0,48	0,51	0,54	0,51	0,50	0,40	0,51
Potassium plasma- tique.....	0,196	0,222	0,177	0,186		0,179	0,234	0,220
Sodium plasmatique	3,35	3,13	3,04	3,09	3,26	3,33	»	3,41
Phosphore minéral.	»	»	»	»	0,015	0,012	»	0,018
Calcium	0,115	0,100	0,100	0,091	0,095	»	0,080	0,093
Fer (grammes par kilog de sang) ...	0,600	0,606	0,512	0,500	0,496	0,507	»	0,578
Hémoglobine p. 100	15,8	15,9	13,5	13,1	13	13,3	»	15,2

Les résultats sont exprimés en grammes par litre.

L'urée, le cholestérol et les lipides ont légèrement baissé. Le quotient sérine globuline, ainsi que le rapport érythroplasmatique du chlore augmentant légèrement, atteignent les chiffres normaux.

L'hémoglobine, déduite du taux du fer, est inchangée.

Le tableau est tout autre deux mois plus tard. Alors que la leucocytose persiste avec des oscillations, cholestérol et lipides

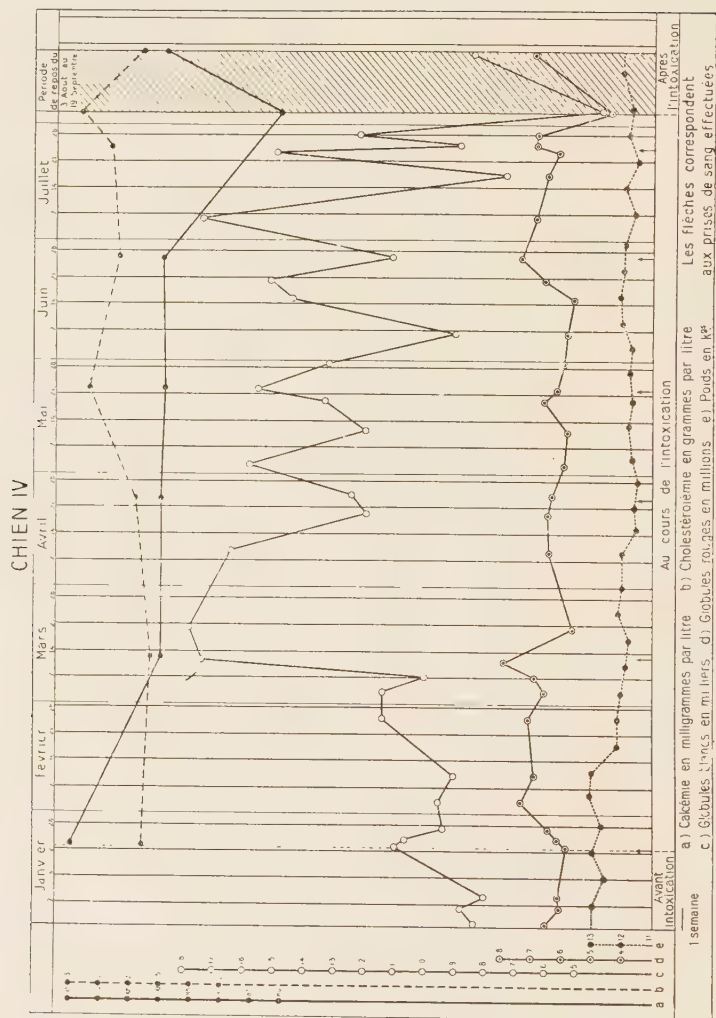


Fig. 10. — Variations du taux des éléments sanguins, du calcium et du cholestérol, au cours de l'intoxication chronique réalisée sur le chien.

ont augmenté, tandis que le rapport sérine/globuline, après s'être inversé, ne peut plus être déterminé par la technique utilisée.

Nous nous sommes demandé si ce résultat n'était pas dû à des modifications profondes des protides. On sait, en effet, que sous l'action des solvants volatils, le potentiel d'oxydo-réduction diminue avec augmentation simultanée de la protéolyse. Pour répondre à cette question, nous avons effectué le dosage de l'azote polypeptidique, dont le taux, dans l'affirmative, serait augmenté. La teneur qui, normalement, est de 0,10 à 0,15 était chez ce Chien de 0,27 le 22 mai.

Le chlore globulaire augmente tandis que le chlore et le potassium plasmatiques diminuent, ainsi que l'hémoglobine.

La 3^e phase, après 5 mois d'intoxication, est marquée par des oscillations plus grandes de la courbe leucocytaire, aboutissant à des taux de globules blancs de plus en plus faibles.

A ce moment le cholestérol et les lipides, après une baisse passagère, remontent progressivement. Le rapport sérine/globuline, peut de nouveau, être déterminé mais reste inversé. Le rapport érythroplasmatique du chlore, se stabilise puis, au moment où la leucopénie apparaît il diminue nettement, avec abaissement du chlore globulaire et augmentation concomitante du chlore et du potassium plasmatiques. La phosphatémie est diminuée ainsi que la calcémie qui s'abaisse finalement à 80 mg. par litre de sérum.

Après avoir laissé le Chien un mois et demi au repos, nous avons repris l'étude de tous ces éléments et nous avons trouvé des chiffres tout à fait comparables à ceux existant avant toute intoxication, tant au point de vue hématologique que chimique, la calcémie n'était toutefois pas revenue au niveau initial.

La chronicité de cette intoxication ne se discute pas, le Chien a subi, pendant sept mois consécutifs, l'intoxication sans présenter aucun symptôme aigu, mais il montrait, vers la fin, des accidents caractéristiques. Nous avons voulu rechercher s'il était possible d'obtenir des résultats comparables, après une durée d'intoxication plus courte, mais en augmentant le temps d'exposition journalière aux vapeurs du toxique. Nous avons, dans ce but, entrepris une nouvelle expérience.

CHIEN V.

Une Chienne, âgée de dix ans environ, pesait 12 kg.,900, le 3 avril, lors de son arrivée. Une prise de sang témoin effectuée quelques jours plus tard, a donné des résultats normaux.

L'intoxication a été commencée huit jours après, elle a duré quatorze semaines. L'animal était placé quatre heures par jour dans la cage ; pendant les deux dernières semaines nous avons doublé ce temps d'exposition. Le débit en atmosphère toxique était de 1.200 litres heure, la concentration moyenne en benzène de 16 mg., 6 par litre. Dans ces conditions, le Chien ne présentait pas de symptômes visibles d'intoxication ; sa température rectale ne subissait aucune variation au cours de l'expérience. Par contre la dose de 18 mg. de benzène par litre atteinte une ou deux fois, par accident, déclenchait une crise caractérisée par de l'agitation, suivie de chute sur le côté avec début de narcose. Les accidents disparaissaient dès que l'animal était sorti de la cage.

Les variations de la température et de l'état hygrométrique de l'atmosphère, ainsi que sa teneur en oxygène et en anhydride carbonique, ont été constamment suivis. La température dans la cage varie au plus de 1 à 2° au cours de l'expérience. L'humidité de l'atmosphère augmente dans la première heure d'intoxication pour atteindre 90 p. 100, puis redescend et se stabilise à 80 p. 100. Après 4 heures, l'air respiré par l'animal renferme 20 p. 100 d'oxygène et 0,6 p. 100 d'anhydride carbonique.

Nous avons poursuivi l'intoxication du 28 avril au 3 août, date à laquelle l'état de l'animal étant particulièrement alarmant, nous avons jugé bon de le sacrifier afin de pouvoir prélever ses organes, en vue d'une étude histologique ultérieure avant qu'ils n'aient subi l'autolyse *post-mortem*.

Nous avons sacrifié l'animal, saigné à blanc, par ponction au cœur. A l'autopsie nous trouvons un panicule adipeux encore important, les organes: rate, surrénales, thyroïdes sont hypertrophiés, le foie est jaune, constatation pouvant avoir des rapports avec l'augmentation de la bilirubinémie constatée dans le sang.

L'examen histologique a été pratiqué après triple coloration :

brésiléine - gram - picrocarmin d'indigo. Il a montré, pour le rein, une légère dégénérescence épithéliale des tubes contournés sans sclérose périglomérulaire.

Quant au foie, il présentait une légère dégénérescence graisseuse, ce qui vient encore à l'appui de l'hypothèse d'une atteinte de la fonction hépatique, sous l'influence du benzène.

Dès le début de l'intoxication l'animal maigrit, la courbe de poids descend régulièrement pendant un mois, reste en plateau pendant six semaines et, à partir de ce moment, marque à nouveau une brusque descente. Cette évolution s'explique par l'état de l'animal ; dès la première quinzaine d'intoxication, celui-ci est triste, abattu, il refuse toute nourriture puis, on constate des alternatives d'amélioration et de rechute, ces dernières caractérisées par des vomissements et de l'anorexie. Vingt-quatre heures après la séance d'intoxication, l'air expiré par l'animal avait encore une odeur nette de benzène. Ce fait paraît démonstratif du degré de l'intoxication réalisée sur cet animal.

Les urines émises se coloraient en noir à l'air et étaient surmontées d'une couche de fins globules de graisse que nous avons caractérisée par l'acide osmique.

Ce fait, que nous avons constaté pour tous les Chiens, avait déjà été signalé chez le Lapin par C. G. SANTESSON [177]. Nous avons recherché la quantité de graisse présente dans l'urine et nous avons trouvé, après extraction par la méthode d'ADAM [64] un taux de 0 g., 16 par litre.

Dès la première semaine de l'intoxication nous avons observé une leucopénie marquée, le nombre des leucocytes tombant de 6.800 à 1.680, cette leucopénie est fugace mais, après quelques larges oscillations, le taux redescend graduellement pour être, au moment de la mort, de 3.000 éléments environ. Nos résultats sont consignés dans le tableau N° XVI.

La courbe des polynucléaires suit, dans ses grandes lignes, la courbe générale des leucocytes. A la leucopénie correspond donc une diminution des polynucléaires avec une augmentation simultanée des moyens mononucléaires.

Le taux des globules rouges qui, pendant plus de deux mois, a marqué une tendance vers l'abaissement, se relève ensuite

TABLEAU N° XVI
INTOXICATIONS CHRONIQUES
Numérations globulaires et formules leucocytaires
Chien V

	DATE	HÉMATIES	LEUCOCYTES	Poly-morpho-nucléaires p. 100	Grands mono-nucléaires p. 100	Moyens mono-nucléaires p. 100	Lymphocytes p. 100	Formes de transition p. 100
Avant l'intoxication	17/4	5.960.000	7.050	80	»	2	18	»
	28/4	5.860.000	6.830	66	»	20	14	»
Au cours de l'intoxication	4/5	6.430.000	1.680	54	»	26	10	10
	7/5	5.640.000	7.670	54	»	16	22	8
	13/5	5.350.000	8.100	80	»	14	6	»
	20/5	5.560.000	5.440	58	6	16	10	10
	22/5	5.680.000	5.340	48	»	36	16	»
	25/5	6.360.000	4.420	»	»	»	»	»
	26/5	»	9.200	»	»	»	»	»
	30/5	5.870.000	4.020	64	6	14	6	10
	2/6	5.815.000	4.900	80	»	4	10	6
	9/6	5.280.000	6.620	53	9	27	11	»
	17/6	3.430.000	5.340	»	»	»	»	»
	20/6	3.290.000	6.000	74	8	10	6	2
	26/6	3.175.000	3.600	40	12	34	10	4
	4/7	4.820.000	4.220	50	12	19	5	14
	9/7	4.054.000	4.450	66	6	20	2	6
	17/7	5.306.000	2.560	62	»	25	13	»
	24/7	»	»	75	»	17	8	»
	25/7	6.434.000	»	58	4	16	16	6
	29/7	6.335.000	3.110	54	6	36	»	4
Mort	3/8	5.180.000	2.870	78	4	16	»	6

aux environs de la normale, pour retomber dans la dernière semaine d'intoxication.

A la fin de l'intoxication, la sédimentation globulaire est modifiée, elle s'effectue beaucoup plus rapidement que chez

l'animal normal ; elle est de 7 mm. en une heure ; c'est à ce moment que l'augmentation du temps de saignement et du temps de coagulation est surtout nette.

Nous avons effectué, à intervalles réguliers, des prises de sang, sur l'animal à jeun, afin de faire le dosage des différents constituants chimiques.

Les résultats que nous avons obtenus sont consignés dans le tableau N° XVII.

TABLEAU N° XVII

INTOXICATIONS CHRONIQUES

Variations du taux de quelques constituants chimiques du sang

Chien V

DÉTERMINATIONS EFFECTUÉES	Avant l'intoxi- cation	Au cours de l'intoxication					
		5/5	26/5	4/7	9/7	29/7	3/8 à la mort
Volume globulaire	0,93	1,26	1,05	0,65	0,63	0,84	0,62
Urée	0,69	0,45	0,77	0,37	»	0,25	»
Glucose	0,85	0,77	0,85	0,97	»	0,70	0,80
Cholestérol	1,62	2,54	3,57	3,75	2,88	3	3,75
Lipides totaux	12,07	15,8	20,95	»	16,8	20,7	17,05
Protides totaux	71,1	75,7	86,4	»	»	63,9	62,1
Sérine	38,2	38,2	»	»	»	22	32,2
Globuline	32,9	37,5	»	»	»	41,9	29,9
Rapport $\frac{\text{sérine}}{\text{globuline}}$	1,16	1,02	»	»	»	0,52	1,07
Chlore globulaire	1,90	1,88	1,75	1,63	2,36	2,35	2,30
Chlore plasmatique	4,09	3,63	3,31	4,35	4,22	4,15	4,49
Rapport : $\frac{\text{chlore globulaire}}{\text{chlore plasmatique}}$	0,46	0,52	0,53	0,36	0,56	0,56	0,51
Potassium plasmatique	0,221	0,190	0,127	»	0,291	0,151	0,167
Sodium plasmatique	3,20	3,04	3,15	3,32	3,22	3,45	»
Phosphore minéral	0,026	0,030	»	0,034	0,025	0,026	0,021
Calcium	0,110	0,097	0,103	»	0,104	0,098	0,091
Fer (grammes par kilog de sang)	0,531	0,574	0,512	0,382	»	0,456	0,329
Hémoglobine p. 100	14,1	15,1	13,5	10,05	»	12	8,65

Les résultats sont exprimés en grammes par litre.

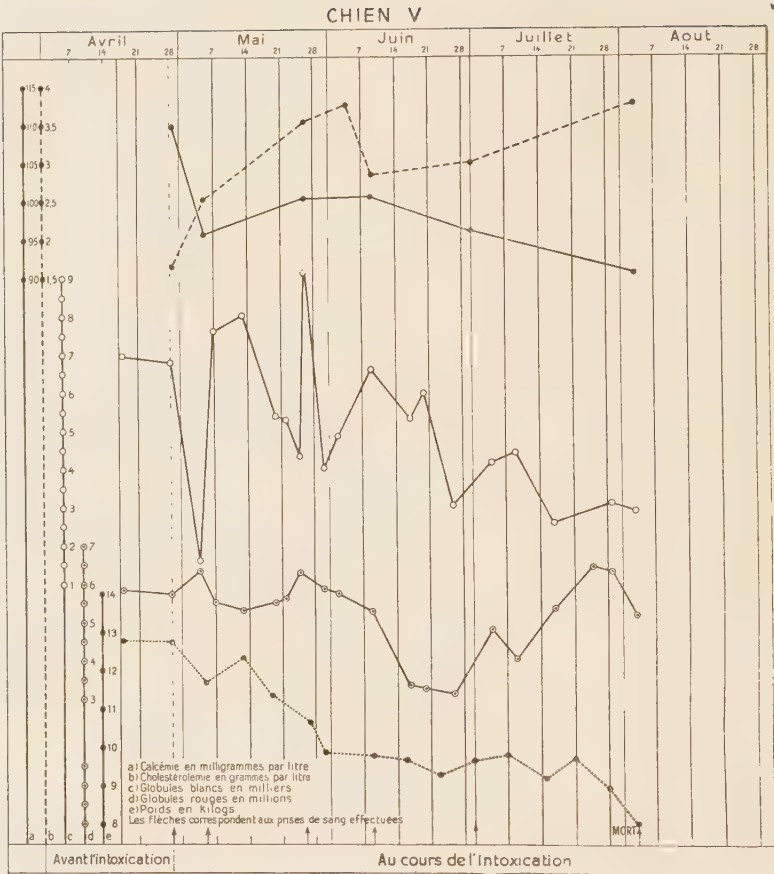


FIG. 11. — Variations du taux des éléments sanguins, du calcium et du cholestérol, au cours de l'intoxication chronique réalisée sur le Chien.

La glycémie ne s'est pas modifiée d'une façon appréciable. L'urée a notablement diminué.

La calcémie, fait constant dans toutes les intoxications, diminue modérément mais d'une façon régulière. Le cholestérol et les lipides totaux augmentent rapidement atteignant des taux très élevés.

Le rapport sérine/globuline diminue, puis, après une longue phase où il ne peut plus être déterminé, il s'inverse, pour redevenir presque normal à la mort ; le taux des polypeptides recherché le 26 mai est de 0 g., 22.

Le chlore globulaire et le chlore plasmatique diminuent progressivement pour remonter ensuite, mais avec un décalage suffisant pour que leur rapport qui, dans l'ensemble, tend à augmenter se trouve temporairement abaissé. Le potassium et le sodium plasmatiques montrent des variations difficilement interprétables. Le phosphore minéral n'est pas notablement modifié.

Le dosage du fer nous permet de connaître d'une façon précise le taux de l'hémoglobine qu'on voit diminuer régulièrement au cours de l'intoxication.

Cette étude sur le Chien nous a permis de souligner, d'une façon indiscutable, une augmentation nette et constante du taux du cholestérol et des lipides et une diminution de la calcémie. Les protides sont également touchés dans leur proportion et dans leur constitution. On peut donc penser que le benzène agit sur le complexe lipido-protidique du sang. Nous avons pu provoquer, chez les Chiens, une leucopénie relative dont le mécanisme s'est montré différent suivant les cas, tantôt elle était due à une diminution des polynucléaires, tantôt à un abaissement du nombre des mononucléaires.

Jusqu'à présent, on n'avait pu réaliser, sur le Chien, l'intoxication chronique par voie respiratoire. Ni K. B. LEHMANN [134], ni B. LUG [112] n'y étaient parvenus par exposition prolongée 7 à 8 heures par jour, pendant plus d'un mois, de ces animaux à des atmosphères de concentration d'environ 10 mg. par litre de benzène.

Les autres animaux de laboratoire semblaient plus sensibles à l'action de ce toxique. Espérant obtenir des résultats encore plus démonstratifs nous avons poursuivi nos expériences d'intoxication chronique, sur le Lapin puis sur le Cobaye et le Rat.

2^o INTOXICATIONS CHRONIQUES RÉALISÉES SUR LE LAPIN.

Six Lapins adultes, d'environ 2 kg., vivent en cages individuelles et sont nourris abondamment de son et de choux. Chaque semaine, les animaux sont pesés à jeun et, tous les dix jours, après incision d'une veinule auriculaire, on détermine le taux de leurs globules, ainsi que leur formule leucocytaire.

Après deux semaines d'observation, les animaux ont été soumis, pendant 29 jours consécutifs, aux vapeurs de benzène, dans la cage respiratoire précédemment décrite. Le débit à l'heure d'atmosphère toxique était de 1.200 litres, la concentration en benzène de 17 mg. par litre. Les animaux supportaient cette teneur pendant 4 heures, sans aucun accident et l'on a pu, deux semaines après le début de l'intoxication, atteindre des temps d'exposition de 8 heures par jour.

La température, à l'intérieur de la cage, variait de 19° à 22°. L'état hygrométrique de l'air qui, à l'origine, était de 70 à 80 p. 100 atteignait, après 10 minutes, 90 p. 100 et se maintenait à 95 p. 100 au cours de l'intoxication. Ce taux élevé s'explique par le fait que les six Lapins étaient ensemble dans la cage et que la quantité de vapeur d'eau expirée était appréciable. Nous avons recherché si, pour la même raison, le taux d'anhydride carbonique dans la cage n'était pas trop élevé. Des dosages dans l'atmosphère nous ont montré que sa teneur atteignait 0,9 p. 100 après huit heures, tandis que le taux d'oxygène se maintenait normal pendant toute la durée de l'expérience.

Malgré un état général se maintenant bon, nous avons constaté, dans tous les cas, une diminution du poids des animaux. Des troubles vaso-moteurs étaient particulièrement nets et, même par incision de l'oreille au niveau de la veine marginale ou des autres vaisseaux nous n'obtenions que très difficilement la goutte de sang nécessaire pour l'examen hématologique.

L. DAUTREBANDE [38] a d'ailleurs décrit des troubles vasomoteurs sous l'influence du benzène.

Après un mois d'intoxication, nous avons interrompu l'expérience, afin d'étudier le retour des animaux à la normale.

Leur poids a augmenté, sauf dans un cas, Lapin III qui, après avoir subi un amaigrissement très notable, qui peut d'ailleurs être rapporté à une tumeur parotidienne, meurt trois mois après l'intoxication. A l'autopsie, on constate une hypertrophie de différents organes : cœur, rein, surrénales.

Le Lapin IV meurt au cours de la dernière prise de sang.

Le Lapin VI succombe deux mois après l'intoxication, avec une dégénérescence graisseuse du foie et une hypertrophie de quelques organes.

Le Lapin V qui présente, à la fin de l'intoxication, une profonde anémie avec forte leucocytose meurt un mois et demi plus tard.

Les Lapins I et II sont encore vivants et bien portants, trois mois après la fin de l'expérience.

Nous avons effectué, sur chaque animal, trois prélèvements de 25 cm³ de sang par ponction cardiaque, à un mois d'intervalle. Le premier, au cours de la période d'observation a fourni les chiffres témoins, le second a été effectué à la fin de l'intoxication et le troisième, un mois après. Le sang prélevé était divisé en quatre fractions.

Les premiers centimètres cubes recueillis à l'aide d'une seringue graduée spéciale, en présence de citrate de sodium, ont servi à l'étude de la sédimentation globulaire. Un centimètre cube, prélevé directement et déféqué immédiatement, servait pour la détermination de la glycémie. Sur une fraction défibrinée, on déterminait le volume globulaire et on dosait le potassium du sang total et du plasma. Le sérum, séparé après coagulation, permettait le dosage du cholestérol et du calcium, ainsi que la détermination des protides totaux et du rapport sérine globuline.

Nous allons donner, tout d'abord, dans une série de tableaux, les résultats obtenus dans les examens hématologiques effectués régulièrement chez les six Lapins (Tableaux Nos XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXIII).

TABLEAU N° XVIII

INTOXICATIONS CHRONIQUES

Modifications de la formule sanguine chez le Lapin

Lapin N° I

	AVANT L'INTO- XICATION	PENDANT L'INTOXICATION			Un mois après la fin de l'into- xication	Deux mois après la fin de l'into- xication
		10 ^e jour	20 ^e jour	30 ^e jour		
Hémoglobine p. 100	95	85	90	60	90	90
Hématies p. mm ³ .	5.685.000	5.595.000	4.940.000	4.933.000	4.930.000	4.585.000
Leucocytes p. mm ³ .	27.300	7.475	4.020	4.390	4.930	4.680
Polymorphonu- cléaires p. 100...	69	42	18	47	43	20
Basophiles p. 100...	»	»	»	4	»	4
Grands mononu- cléaires p. 100...	4	8	6	6	11	7
Moyens mononu- cléaires p. 100...	2	10	6	8	11	7
Lymphocytes p. 100	24	41	64	32	27	58
Formes de transi- tion p. 100.....	1	4	»	3	8	3
Cellules de Türk p. 100.....	»	»	6	»	»	1
Normoblastes p.100	»	»	»	1	1	»
Poids en kgs.....	2,350	2,080	1,965	1,885	2	3,445

TABLEAU N° XIX

INTOXICATIONS CHRONIQUES

Modifications de la formule sanguine chez le Lapin

Lapin N° II

	AVANT L'INTO- XICATION	PENDANT L'INTOXICATION			Un mois après la fin de l'into- xication	Deux mois après la fin de l'into- xication
		10 ^e jour	20 ^e jour	30 ^e jour		
Hémoglobine p. 100	70	75	80	80	80	95
Hématies p. mm ³ ..	4.710.000	4.855.000	3.840.000	5.541.000	3.095.000	5.630.000
Leucocytes p. mm ³ .	11.840	9.080	5.710	6.250	4.775	7.600
Polymorphonu- cléaires p. 100...	69	27	44	55	53	45
Basophiles p. 100..	»	»	»	»	»	1
Grands mononu- cléaires p. 100...	3	2	1	7	4	7
Moyens mononu- cléaires p. 100...	8	10	14	5	9	10
Lymphocytes p.100	18	54	29	25	28	35
Formes de tran- sition p. 100.....	3	6	9	5	3	2
Cellules de Türck p. 100	»	1	3	3	3	»
Poids en kgs.....	2,200	1,940	1,850	1,780	2,130	3.810

TABLEAU N° XX

INTOXICATIONS CHRONIQUES

Modifications de la formule sanguine chez le Lapin

Lapin N° III

	AVANT L'INTO- XICATION	PENDANT L'INTOXICATION			Un mois après la fin de l'intoxi- cation	Deux mois après la fin de l'intoxi- cation
		10 ^e jour	20 ^e jour	30 ^e jour		
Hémoglobine p. 100	85	90	80	80	70	70
Hématies p. mm ³ ..	4.890.000	5.230.000	5.035.000	5.220.000	5.006.000	4.585.000
Leucocytes p. mm ³ .	9.360	8.650	8.720	6.400	7.670	4.680
Polymorphonu- cléaires p. 100...	68	54	60	52	20	»
Basophiles p. 100..	»	»	1	1	»	»
Grands mononu- cléaires p. 100...	3	4	»	4	2	»
Moyens mononu- cléaires p. 100...	11	6	10	6	5	»
Lymphocytes p.100	15	30	19	35	56	»
Formes de tran- sition p. 100.....	2	3	10	»	6	»
Cellules de Türk p. 100	{ Myélo- cyte éosi- nophile	3	»	1	1	»
Poids en kgs.....		2,350	2,300	2,100	1,800	1,760
				1,800	1,760	1,625

TABLEAU N° XXI

INTOXICATIONS CHRONIQUES

Modifications de la formule sanguine chez le Lapin

Lapin N° IV

	AVANT L'INTO- NICATION	PENDANT L'INTOXICATION			UN MOIS après la fin de l'intoxication
		10 ^e jour	20 ^e jour	30 ^e jour	
Hémoglobine p. 100...	95	85	80	60	70
Hématies par mm ³ ...	5.540.000	4.216.000	4.250.000	4.441.000	3.685.000
Leucocytes par mm ³ ..	9.180	12.050	8.340	3.840	7.950
Polymorphonucléaires p. 100	46	19	46	20	61
Basophiles p. 100.....	»	»	»	1	1
Grands mononucléaires p. 100.....	1	7	3	2	2
Moyens mononucléaires p. 100.....	7	21	4	6	15
Lymphocytes p. 100..	41	51	40	66	12
Formes de transition p. 100	3	2	5	3	2
Cellulesde Türck p.100	»	»	»	2	7
Poids en kgs.....	1,930	1,830	1,750	1,700	2,050

TABLEAU N° XXII

INTOXICATIONS CHRONIQUES

Modifications de la formule sanguine chez le Lapin

Lapin N° V

	AVANT L'INTO- XICATION	PENDANT L'INTOXICATION			UN MOIS après la fin de l'intoxication
		10 ^e jour	20 ^e jour	30 ^e jour	
Hémoglobine p. 100..	100	75	75	80	50
Hématies par mm ³ ...	5.200.000	3.875.000	4.295.000	2.860.000	2.230.000
Leucocytes par mm ³ ..	9.180	8.570	6.020	5.540	18.000
Polymorphonucléaires p. 100.....	64	39	47	62	39
Basophiles p. 100.....	»	»	3	»	2
Grands mononucléaires p. 100.....	1	2	1	1	5
Moyens mononucléaires p. 100.....	1	3	4	10	14
Lymphocytes p. 100...	30	51	45	19	38
Formes de transition p. 100.....	3	5	4	8	1
Cellules de Türk p. 100	1	»	4	»	1
Poids en kgs.....	2,900	2,825	2,780	2,440	2,440

TABLEAU N° XXIII

INTOXICATIONS CHRONIQUES

Modifications de la formule sanguine chez le Lapin

Lapin N° VI

	AVANT L'INTO- XICATION	PENDANT L'INTOXICATION			Un mois après la fin de l'intoxication
		10 ^e jour	20 ^e jour	30 ^e jour	
Hémoglobine p. 100..	95	85	90	70	70
Hématies par mm ³	5.350.000	4.694.000	5.270.000	4.285.000	4.626.000
Leucocytes par mm ³ ..	9.060	7.330	7.330	7.450	8.020
Polymorphonucléaires p. 100.....	29	17	15	30	34
Basophiles p. 100.....	»	»	»	»	»
Grands mononucléaires p. 100.....	1	1	1	5	2
Moyens mononucléaires p. 100.....	6	11	13	2	11
Lymphocytes p. 100...	61	66	70	62	50
Formes de transition p. 100.....	3	3	»	»	2
Cellules de Türck p. 100	»	2	1	1	»
Poids en kgs.....	2,240	2,100	2,160	1,880	2,400

Nous avons groupé dans ces tableaux, sous la rubrique polymorphonucléaires, les neutrophiles, les éosinophiles et les pseudo-éosinophiles, ces derniers, qui, comme on le sait, sont des éléments normaux du sang du Lapin difficilement différenciables des éosinophiles vrais.

De l'examen de ces tableaux, nous pouvons tirer des conclusions fort intéressantes. Nous notons, dans tous les cas, une tendance vers l'anémie, avec anisocytose (irrégularité de taille des hématies) et poïkilocytose (déformation des hématies), se prolongeant généralement plus d'un mois après l'intoxication. Mais nous trouvons surtout une diminution du nombre des globules blancs, très nette pour quatre animaux, moins accentuée pour les deux autres. Cette diminution est accompagnée, dans tous les cas, d'un abaissement du taux des granulocytes et d'une lymphocytose relative. Au cours de l'intoxication, on voit apparaître des éléments anormaux : polynucléaires basophiles, cellules de Türk ou normoblastes. Nous avons noté, en outre, que, sous l'influence de l'intoxication, la sédimentation globulaire s'effectuait moins rapidement.

Nous avons groupé dans un double tableau (XXIV, XXV) les résultats des dosages chimiques effectués. Ils sont exprimés en grammes de substance par litre. Les chiffres romains indiquent les numéros d'ordre des Lapins intoxiqués. Les chiffres, caractères gras, répétés pour chaque élément dosé, permettent de repérer le moment où a été effectuée la saignée, donc le dosage : **1** correspond aux dosages témoins effectués avant toute intoxication, **2** indique les résultats obtenus aussitôt après l'interruption de l'intoxication et **3** ceux trouvés un mois plus tard. Certains chiffres témoins ne figurant pas dans les tableaux, nous avons pensé pouvoir nous faire une idée de leur valeur en effectuant les mêmes dosages chez des Lapins normaux vivant dans des conditions analogues. Le rapport érythroplasmatique a été en moyenne de 0,47, oscillant chez nos animaux de 0,36 à 0,57. Les protides totaux avaient une teneur moyenne de 58 g., 4, celle-ci variant de 49 g., 6 à 67 g., 6.

Le taux moyen de sérine était de 41 g., 2, les valeurs extrêmes étant d'une part, 34 g., 2, d'autre part, 48 g., 1. Pour la globuline

nous trouvions 15 g., 6 comme teneur moyenne, 15 g. et 17 g., 6 étant les chiffres les plus éloignés. Le rapport sérine/globuline s'est maintenu aux environs de 2,66. Le potassium, tant plasmatique que globulaire, montre des variations plus importantes ; les valeurs moyennes étaient respectivement de 0 g., 340 et 4 g., 12, les taux extrêmes étant d'une part, 0 g., 231 et 0 g., 540, d'autre part, 3 g., 77 et 4 g., 43.

Ces chiffres n'ont évidemment qu'un intérêt relatif, mais nous avons pu, à défaut des chiffres témoins, en tirer un enseignement et comparer, dans une certaine mesure, ces taux normaux moyens aux taux obtenus après intoxication.

TABLEAU N° XXIV

INTOXICATIONS CHRONIQUES

Variations du taux de quelques constituants chimiques du sang chez le Lapin

LAPINS		I	II	III	IV	V	VI	Moyennes
Rapport érythro-plasmatique	1	0,47	0,40	0,48	0,51	0,52	0,57	0,49
	2	0,45	0,56	0,73	0,56	0,46	0,67	0,57
	3	0,46	0,47	0,44	0,35	0,23	0,41	0,39
Calcium	1	0,137	0,139	0,150	0,131	0,122	0,134	0,135
	2	0,100	0,115	0,107	0,097	0,112	0,131	0,110
	3	0,117	0,088	0,089	0,101	0,100	0,112	0,101
Potassium du plasma	1	0,540	0,290	0,314	0,460	0,335	0,339	0,379
	2	0,350	0,354	0,216	0,325	0,422	0,334	0,333
	3	0,290	0,315	0,390	0,475	0,310	0,509	0,381
Potassium des globules	1	»	»	»	»	»	»	4,12
	2	3,65	3,81	3,02	3,97	»	3,56	3,60
	3	3,84	4,20	4,20	4,02	3,66	3,44	3,89
Glucose	1	1,24	1,63	1,29	0,89	1,20	1,49	1,29
	2	0,78	0,60	1,09	1,04	1,68	1,42	1,10
	3	3,11	1,26	1,63	1,84	1,06	2,32	1,87

TABLEAU N° XXV

INTOXICATIONS CHRONIQUES

Variations du taux de quelques constituants chimiques du sang chez le Lapin

LAPINS		I	II	III	IV	V	VI	Moyennes
Cholestérol	1	0,37	0,51	0,54	0,62	0,30	0,40	0,46
	2	1,11	0,63	1,18	0,38	0,54	0,53	0,73
	3	0,74	0,84	1,02	0,42	0,75	0,24	0,67
Protides totaux....	1	63,9	67,6	60,4	49,6	56,4	63,9	60,3
	2	69	70,1	62	55,8	67,7	66,4	65,1
	3	57,7	73,5	59,8	57,8	50	59,6	59,7
Sérine	1	"	"	"	"	40,4	48,1	41,2
	2	47,1	41,7	39,3	31,2	45,2	41,3	40,9
	3	41,5	52,2	44,9	47,6	24,7	36	41,1
Globuline	1	"	"	"	"	16	15,8	15,6
	2	21,9	28,4	22,7	24,6	22,5	25,1	24,2
	3	16,2	21,3	14,9	10,2	25,3	23,5	18,6
Rapport $\frac{\text{sérine}}{\text{globuline}}$..	1	"	"	"	"	2,52	3,04	2,66
	2	2,15	1,47	1,73	1,27	2,01	1,64	1,69
	3	2,56	2,45	3,01	4,66	0,97	1,52	2,21

Si l'on examine les tableaux Nos XXIV et XXV, on voit, tout d'abord, que le taux du calcium subit une diminution très nette qui atteint, en moyenne, 20 p. 100, cet abaissement persiste et même s'accroît un mois après la cessation de l'intoxication.

Si l'abaissement du calcium a été constant chez les six animaux en expérience, les modifications obtenues pour le potassium varient d'un Lapin à l'autre et il nous paraît difficile d'en tirer une conclusion quelconque, bien que les chiffres moyens indiquent une diminution du potassium plasmatique suivie du retour à la normale, un mois après la fin de l'intoxication.

La glycémie a donné également des résultats inconstants, toutefois on observe, après l'intoxication, une tendance à l'hyperglycémie.

Le cholestérol montre, dans cinq cas sur six, une augmentation; le taux moyen a presque doublé, redescendant légèrement après un mois de repos. On observe également une légère augmentation des protides totaux, avec retour à la normale, un mois après intoxication.

Le taux de la sérine reste pratiquement constant, tandis que la globuline augmente, et le rapport de ces deux constituants diminue, sans toutefois s'inverser. Il remonte ensuite dans la période de rétablissement. En résumé, nous retrouvons, chez le Lapin, deux modifications très nettes, déjà observées chez le Chien après intoxication : hypocalcémie constante d'une part, hypercholestérolémie importante d'autre part.

3^o INTOXICATIONS CHRONIQUES RÉALISÉES SUR LE COBAYE

Nous ne signalerons que très brièvement les résultats obtenus sur le Cobaye, car nous n'avons opéré que sur deux individus. Ils ont été intoxiqués pendant deux mois, quatre heures par jour, à la dose moyenne de 16 mg., 8 par litre, au débit de 1.200 litres heure.

Les animaux ont maigri et l'on a observé, au cours de l'intoxication, une légère diminution du taux des globules blancs qui n'a jamais atteint cependant des chiffres très inférieurs à la normale. Les dosages effectués dans le sang ne nous ont montré aucune modification intéressante.

4^o INTOXICATIONS CHRONIQUES RÉALISÉES SUR LE RAT

Les intoxications chroniques relatées précédemment et réalisées sur le Chien, le Lapin, nous ont montré des modifications

importantes des constituants du sang et, en particulier, du calcium et du cholestérol. Nous avons trouvé également, dans la plupart des cas, une diminution du nombre des globules blancs. Cependant, cette diminution réalisait rarement le type des leucopénies profondes décrites par divers auteurs et signalées déjà par C. G. SANTESSON [177], en 1897. Celui-ci, examinant le sang d'un ouvrier intoxiqué par le benzène, note, à côté d'une légère anémie à 3 millions de globules, une diminution considérable des leucocytes, à tel point qu'il ne trouvait aucun de ces éléments dans le champ de la cellule utilisée pour les numérations. Nous espérons pouvoir, chez le Rat, réaliser plus facilement de tels syndromes hématologiques.

Ces considérations nous ont conduit à expérimenter sur cet animal. Les prises de sang répétées étant impossibles sur le Rat, nous avons dû comparer nos résultats avec ceux d'animaux témoins.

Nous avons opéré sur des Rats blancs adultes, vivant dans un endroit bien aéré, à température constante, dans des cages à double fond permettant l'élimination de l'urine et des fèces.

Ils étaient nourris abondamment de pain trempé dans du lait et pesés à jeun, chaque semaine. Nous avons utilisé 26 Rats, identifiés à l'aide de colorants et divisés en deux lots.

Un lot était composé de 17 animaux destinés à l'expérimentation, l'autre de 9 témoins. Chaque lot était placé dans une cage différente.

Afin de déterminer la concentration du toxique à employer, nous avons, dans des expériences préliminaires, étudié le comportement de Rats séjournant 12 heures dans des atmosphères titrant 20, 10 et 5 mg. de benzène par litre. La dose de 20 mg. s'est avérée trop élevée, provoquant la mort dans le tiers des cas et la narcose avec leucopénie dans les autres.

La dose de 10 mg. produit encore des phénomènes de narcose et d'irritation.

Avec 5 mg., aucun effet toxique notable n'est constaté. Nous avons donc adopté cette dose et utilisé le dispositif expérimental habituel.

Les animaux sont placés 12 heures par jour dans la cage où l'atmosphère toxique est renouvelée, à la cadence de 120 litres à l'heure.

Dans ces conditions, la température ne varie pas de plus de 1° au cours de l'expérience, l'humidité de l'air s'élève rapidement et se stabilise à 95 p. 100 ; l'atmosphère est donc presque saturée de vapeur d'eau, condition difficilement modifiable en raison de la ventilation pulmonaire élevée du Rat et de l'émission de l'urine au cours de l'expérience.

L'analyse de l'atmosphère de la cage, aux divers stades de l'inhalation, a montré un taux constant d'oxygène, voisin de 20 p. 100, et une teneur en anhydride carbonique augmentant graduellement, sans jamais dépasser 1 p. 100.

Le dosage du benzène effectué par notre méthode spectrographique à toujours concordé, à moins de 10 p. 100 près, avec le chiffre théorique. Le critère de l'action nocive du benzène étant son action sur les éléments figurés du sang, le comportement des animaux, au cours de l'intoxication, a été suivi par des numérations globulaires et par l'établissement de formules leucocytaires.

Ces examens étaient effectués parallèlement chez les Rats témoins, tous les 10 jours sur l'animal à jeun, le prélèvement étant fait à la veine saphène externe.

Avec cette dose de 5 mg. de benzène par litre, les Rats ont subi cette intoxication sans donner de signes cliniques d'intolérance, aussi avons-nous pu doubler la dose, vers le milieu de la période d'intoxication qui a duré six semaines. Cette dose a été mieux tolérée que lors des essais préliminaires, probablement à cause de l'accoutumance ; cependant deux animaux moururent au bout d'une semaine. Ils présentaient une diminution nette du nombre des leucocytes, l'un d'eux avait même une leucopénie profonde caractéristique ; le nombre de leucocytes étant tombé de 8.780 à 612, tandis que le taux des polynucléaires passait de 24 à 62 p. 100. Au cours de l'intoxication, quatre animaux moururent, à la suite d'un accident fortuit. Ils avaient déjà une leucopénie nette.

Les animaux ayant survécu présentèrent une perte de poids

d'environ 20 p. 100, tandis que le poids des témoins augmentait de 11 p. 100, en moyenne, pendant la période correspondante.

Nous avons noté, chez les Rats intoxiqués, une polyglobulie, mais ce même phénomène a été observé également, quoique à un degré moindre, chez les animaux témoins. Par contre, fait essentiel, alors que les témoins ne présentaient aucune modification appréciable du taux leucocytaire, nous avons pu constater, chez nos animaux intoxiqués, un abaissement considérable du nombre des leucocytes qui a atteint, en moyenne, 55 p. 100 et qui, dans trois cas, a été supérieur à 80 p. 100. Ces résultats sont consignés avec quelque détail, dans le tableau N° XXVI.

TABLEAU N° XXVI INTOXICATIONS CHRONIQUES

Modifications du taux des éléments figurés du sang chez les Rats

RAT N°	PERTE de poids p. 100	TAUX des hématies avant intoxication	TAUX des hématies après 6 semaines d'intoxication	Variations des hématies p. 100	TAUX des leu- cocytes avant intoxi- cation	Taux minimum leucocytaire observé au cours de l'intoxication	Variations des leucocytes p. 100	Hémoglobine p. 100	
								Avant intoxi- cation	Après 6 sem.
I	13,4	10.300.000	14.600.000	+ 41	6.000	3.350	— 44	90	90
II	13,4	9.006.000	10.855.000	+ 18	8.400	5.540	— 34	90	85
III	19	6.175.000	9.300.000	+ 33,5	10.360	4.970	— 52	90	90
IV	27	9.530.000	9.810.000	+ 2,8	11.300	4.930	— 56	90	85
V	22	7.646.000	10.444.000	+ 36,5	6.860	4.600	— 33	90	85
VI	17	8.680.000	9.225.000	+ 6	12.770	2.080	— 83	90	80
VII	24	5.233.000	11.110.000	+ 112	10.060	4.700	— 53	90	75
VIII	15	10.430.000	11.190.000	+ 7	5.950	5.500	— 75	90	80
IX	26	9.016.000	11.860.000	+ 24	6.300	1.130	— 82	95	80
X	21	5.008.000	10.837.000	+ 116	10.560	900	— 91	90	85
XI	27	8.522.000	11.275.000	+ 32	5.360	4.790	— 10,6	90	80
Moyenne:	20			+ 34			— 55		

Les modifications du taux des éléments rouges et blancs s'accompagnent de changements profonds dans la formule leucocytaire, se traduisant dans la majorité des cas, par une

polynucléose relative accompagnée d'une diminution corrélative du nombre des mononucléaires.

Après six semaines d'intoxication, les Rats, tant ceux traités que les témoins, ont été sacrifiés par section des carotides. Le sang a été recueilli, afin d'effectuer les dosages de quelques constituants chimiques ; d'autre part, des frottis de moelle osseuse ont été effectués et colorés par la méthode de MAY GRUNWALD GIEMSA.

La moelle, hyperplasique, présentait de nombreuses cellules souches avec absence presque complète de polynucléaires et de métamyélocytes. On notait une augmentation du taux des normoblastes et la présence de nombreuses cellules éosinophiles à granulations très fines, de quelques gros éléments à protoplasme bleu pâle avec noyau excentrique, rappelant les réticulocytes et présentant des granulations éosinophiles. Enfin nous avons noté l'existence d'une dégénérescence cellulaire.

Normalement, la moelle du Rat est très pauvre en éléments et tout à fait éloignée de ce tableau.

En résumé, la moelle des Rats intoxiqués est hyperplasique, avec tendance marquée à l'éosinophilie, elle présente des signes nets de dégénérescence cellulaire.

D. H. ANDERSEN [6] a rapporté un cas clinique d'intoxication benzénique où la leucopénie s'accompagnait de l'hyperplasie de la moelle osseuse.

Les dosages chimiques ne pouvaient pas tous être faits sur chacun des Rats. Nous avons donc divisé les deux séries d'animaux en deux lots, les animaux intoxiqués étant numérotés de I à XI et les témoins de XII à XX.

Dans le sérum des animaux du premier lot, nous avons déterminé le cholestérol, les protides totaux et le rapport sérine/globuline. Dans le sang des Rats du second lot, nous avons mesuré le volume globulaire à l'hématocrite et dosé le potassium du sang total. Nous n'avons pu, malheureusement, effectuer ce même dosage sur le plasma, la quantité de sang obtenue étant trop faible.

Ces résultats ont été groupés dans les tableaux Nos XXVII et XXVIII.

TABLEAU N° XXVII

INTOXICATIONS CHRONIQUES

Taux de quelques constituants chimiques du sang chez le Rat intoxiqué
et chez le Rat normal

RATS N°.....	ANIMAUX INTOXiquÉS					ANIMAUX TÉMOINS					Moy. Rats into- xiqués	Moy. Rats témoins	Variations p. 100
	I	II	III	IV	V	XII	XIII	XIV	XV	XVI			
Cholestérol....	1,13	1	1,01	0,77	1,21	0,80	1,44	0,93	—	1,15	1,02	1,08	— 5
Protides totaux	74	76	74,7	75	78,3	76,4	94,7	88,6	71,3	74,2	75,6	81	— 6,6
Sérine.....	33,9	25,4	30	28,5	36,4	30	44,6	46,2	33,1	37,8	30,8	38,3	— 19,5
Globuline.....	40,1	50,6	44,7	46,5	41,9	46,4	50,1	42,2	38,2	36,4	44,8	42,6	+ 5
Rapport sérine globuline.....	0,85	0,50	0,67	0,61	0,87	0,65	0,89	1,1	0,86	1,04	0,69	0,90	— 23

TABLEAU N° XXVIII

INTOXICATIONS CHRONIQUES

Taux de quelques constituants chimiques du sang chez le Rat intoxiqué
et chez le Rat normal

RATS N°....	Animaux intoxiqués				Animaux témoins				Moy. Rats into- xiqués	Moy. Rats témoins	Variations p. 100
	VI	VII	VIII	XI	XVII	XVIII	XIX	XX			
Volume globulaire..	1,66	1,66	1,14	—	—	0,70	0,75	—	0,69	1,37	+ 98
Potassium du sang total.	2,14	2,09	2,10	2,20	2,17	1,91	1,73	2,07	2,13	1,97	+ 8

On ne constate pas de modifications appréciables du cholestérol ni des protides totaux. La diminution du rapport sérine /globuline, déjà constatée chez le Lapin, s'effectue ici suivant un mécanisme différent. Au lieu d'une augmentation des globulines, on constate, en effet, chez le Rat, une diminution de la sérine.

Le sang des animaux intoxiqués est beaucoup plus riche en globules que celui des témoins. Le potassium étant principalement contenu dans les globules, tend à augmenter dans le sang total des animaux intoxiqués.

Les accidents chroniques constatés chez nos animaux, nous permettent de préciser le mécanisme de l'intoxication benzénique.

Tout d'abord, nous devons noter les différences dans le comportement des diverses espèces animales vis-à-vis du benzène.

Le Lapin et le Rat se sont montrés nettement plus sensibles. Sur le Chien, plus résistant, nous avons pu néanmoins réaliser un syndrome d'intoxication caractéristique et obtenir, dans tous les cas, une leucopénie typique.

Le Chien se défend contre l'intoxication, par mobilisation d'une partie de ses réserves de graisse, qui viennent augmenter le taux des lipides circulants. Le complexe lipido-protidique est profondément modifié. Les globulines ne sont plus précipitables, dans les conditions normales, tandis que le taux des polypeptides paraît augmenté. Le rapport érythroplasmatique de certains éléments est également modifié. Ce fait est surtout net pour le chlore dont le taux augmente dans les globules et diminue dans le plasma.

Le phosphore minéral plasmatique a tendance à diminuer.

Le taux du calcium est abaissé d'une manière modérée, mais constante.

Les variations du sodium et du potassium plasmatiques sont irrégulières et difficilement interprétables. Les modifications du taux du fer coïncident parfaitement avec celles du nombre des hématies.

Si ces variations de la teneur des éléments du sang se retrouvent chez tous les Chiens, il existe néanmoins des modalités dans leur apparition. C'est ainsi que, si une inhalation de quatre heures

par jour provoque rapidement ces différents symptômes, une durée deux fois moindre ne les fait apparaître qu'après de longs mois.

Les Lapins et les Rats ont montré des modifications tout à fait typiques des éléments figurés du sang. La leucopénie est accompagnée d'une agranulocytose avec lymphocytose relative chez les Lapins et d'une tendance à la polynucléose chez les Rats.

L'hypercholestérolémie, chez le Lapin, est moins nette que chez le Chien, probablement en raison du régime alimentaire, beaucoup moins riche en graisse.

Le rapport sérine/globuline est diminué, mais par un mécanisme différent. Chez le Lapin, ce phénomène est lié à l'augmentation des globulines ; chez le Rat, il est en rapport avec la diminution de la sérine.

L'hypocalcémie est extrêmement nette chez le Lapin et vient confirmer les résultats du même ordre, signalés pour le Chien. Si les chiffres obtenus pour le potassium globulaire, chez le Lapin, sont assez variables suivant les animaux, il ressort néanmoins, qu'en moyenne, le taux est diminué dans les globules et dans le plasma.

Chez le Rat, les dosages du potassium n'ont pu être effectués que sur le sang total et, si les chiffres obtenus chez les animaux intoxiqués sont peu différents de ceux des témoins, on peut penser néanmoins que le taux du potassium globulaire est diminué dans le premier cas, puisque la quantité relative de globules est plus élevée.

Nous voyons donc que l'intoxication chronique provoque, chez les animaux d'expérience, non seulement une modification de la formule sanguine, mais aussi des troubles marqués de certains constituants chimiques du sang et de l'équilibre érythroplasmatique.

Nous avons eu l'occasion d'effectuer l'analyse du sang d'un ouvrier hospitalisé dans le service du Professeur DUVOIR à l'hôpital Saint-Louis.

Le malade avait travaillé pendant deux ans dans une fabrique d'imperméables où il manipulait journellement des solutions de caoutchouc dans le benzène.

L'examen du sang a été fait au cours d'une rechute due à une reprise prématurée du travail.

Le taux des globules rouges était de 3.000.000, celui des leucocytes de 3.500.

Nous avons obtenu les résultats suivants exprimés en grammes par litre.

Urée	0,55
Cholestérol	2,35
Sérine.....	54
Globuline.....	23,5
Rapport sérine /globuline	2,29
Calcium	0,094

L'augmentation du cholestérol et le chiffre un peu faible du calcium semblent confirmer les résultats de nos recherches expérimentales.

CHAPITRE IX

SORT DU BENZÈNE DANS L'ORGANISME

A. — Localisation

Les premières données expérimentales sur la répartition du benzène dans l'organisme sont dues à G. JOACHIMOGLU [107], en 1915. Cet auteur a mis au point une méthode de dosage du benzène dans le sang et les organes et réalisé, sur trois Chats et un Chien, des intoxications aiguës par voie respiratoire et, sur un Cobaye, une intoxication par voie gastrique. Les Chats, placés dans une atmosphère renfermant 55 à 60 mg. de toxique par litre, sont morts en moins de 2 heures.

Le benzène était surtout localisé dans le cerveau, 70 mg. p. 100 g., dans le foie, 25 mg. et dans le sang, 12 mg. Le tissu adipeux, examiné dans un cas, s'est montré très pauvre en benzène, 1 mg., 5 p. 100 g. Chez le Chien, mort en 2 heures 1/2, G. JOACHIMOGLU [107], trouve la moelle épinière très riche en toxique, 27 mg. p. 100 g., puis vient le cerveau, avec 18 mg., 2, le foie, 12 mg., 6 et le sang, 6 mg., 6.

Dans le cas du Cobaye ayant reçu 15 cm³ de benzène, par voie gastrique à l'aide d'une sonde, le cerveau se montre le plus riche, avec 31 mg., puis le foie, avec 13 mg. p. 100 g. de tissu frais. Cet auteur a eu le grand mérite de montrer que le benzène avait une grande affinité pour les lipides du cerveau et de la moelle épinière, fait expliquant les accidents nerveux constatés lorsque la dose toxique est assez élevée.

Des recherches sur la localisation du benzène dans l'organisme ont été effectuées par A.O. GETTLER [79], en 1923, puis par G.F. KOPPENHÖFER [116], en 1935, chez des individus ayant succombé à des intoxications aiguës, dans un cas, par

inhalation d'une mixture à base de benzène, dans l'autre, à la suite d'un accident s'étant produit au cours du nettoyage, au moyen de benzol, d'une cuve ayant contenu de l'asphalte. Ces auteurs, utilisant la méthode de G. JOACHIMOGLU [107] qu'ils avaient légèrement modifiée, ont pu doser le benzène dans les viscères et en retrouver des quantités appréciables.

La recherche du benzène dans le sang et les organes est donc une confirmation précieuse pour le diagnostic médico-légal.

Ces travaux ne nous permettent pas de tirer de conclusion intéressante au point de vue de la localisation. Les intoxications semblent s'être déroulées dans des conditions analogues et cependant, les teneurs en benzène des organes sont tout à fait différentes.

Il nous a semblé intéressant de préciser certaines notions et de rechercher, non seulement la teneur en benzène des principaux viscères, mais aussi, d'étudier, grâce à la méthode très sensible que nous avons mise au point, sa localisation dans certains organes de volume restreint, mais dont l'importance physiologique est primordiale, nous voulons parler des glandes à sécrétion interne.

Dans ce but, nous avons effectué nos expériences sur le Chien dont les organes ont une taille suffisante pour être facilement séparés et nous avons étudié la localisation du benzène dans l'intoxication aiguë ou chronique.

Dès la mort de l'animal, le sang et les principaux organes : foie et bile, poumons, reins, rate, cœur, pancréas et une quantité suffisante (80 g. environ) de tissu adipeux, étaient prélevés, ainsi que les glandes endocrines. Le cerveau et le cervelet ont été recueillis soit en bloc, soit séparément. Nous avons prélevé la moelle osseuse : les os longs étaient débarrassés du tissu musculaire qui s'insérait sur eux, puis sciés perpendiculairement à leur grand axe, la moelle était aspirée à l'aide d'une pipette effilée. Tous ces tissus étaient introduits immédiatement dans des flacons préalablement refroidis, de taille en rapport avec le volume de l'organe. Ces flacons hermétiquement fermés étaient portés aussitôt à la glacière. Les dosages étaient effectués dans

les 24 heures suivant le prélèvement, selon notre technique décrite précédemment.

Nous avons toujours vérifié que le benzène était extrait en totalité des viscères, et, dans ce but, nous faisons une seconde extraction à partir du résidu. Pour les moyens et les petits organes, nous n'avons jamais décelé de trace de benzène dans le distillat ainsi obtenu. Pour les gros organes, tels que le foie, nous avons parfois trouvé, dans ces conditions, de faibles quantités de benzène, ne dépassant pas 5 p. 100 du total. Pour le sang et le tissu adipeux nous avons opéré avec les précautions indiquées dans la technique et nous avons obtenu ainsi de bons résultats.

Rappelons que notre méthode de dosage nous permet d'apprécier des quantités de benzène comprises entre 2 et 5 mg. Cette sensibilité a suffi dans la plupart des cas, cependant, il nous a fallu parfois évaluer des teneurs plus faibles, nous y sommes parvenu en comparant les spectres d'absorption obtenus à ceux de dilutions croissantes de benzène dans l'alcool; l'erreur, dans ce cas, est inférieure à 10 p. 100.

I. — INTOXICATIONS AIGÜES

Nous avons effectué nos dosages sur les viscères des Chiens dont les intoxications ont été décrites précédemment. Nous conserverons ici le numéro qui les désigne, ce qui nous permettra de ne rappeler que très brièvement les conditions dans lesquelles les intoxications ont été effectuées.

Nous distinguerons ici encore, l'intoxication suraiguë de l'intoxication subaiguë.

1. — INTOXICATIONS SURAIGÜES.

CHIEN I.

Ce Chien qui pesait 12 kg., 800 a subi une intoxication mortelle, en 37 minutes, par inhalation d'une atmosphère titrant 50 mg. de benzène par litre.

La localisation du benzène dans les viscères de cet animal ressort de l'examen du tableau N° XXIX.

TABLEAU N° XXIX

Localisation du benzène au cours de l'intoxication suraiguë

Chien I

ORGANES OU TISSUS PRÉLEVÉS	POIDS du prélèvement en grammes	TAUX de benzène en mg. dans l'échantillon	TAUX de benzène en mg. pour 100 g.	RÉSULTATS exprimés par rapport au taux du sang pris pour unité
Foie	452	90	19,9	1,8
Poumons	118,5	6	5	0,4
Reins	83	2	2,4	0,1
Rate	40,5	5	12	1
Cœur	98	6	6,1	0,5
Cerveau	63	20	31,8	27
Surrénales	1,62	0,5	30,9	2,6
Sang	67	8	11,9	1

La teneur du sang est relativement élevée. Elle correspond au taux obtenu par N. W. LAZAREW [127], chez le Lapin, dans des conditions analogues. Si nous comparons la teneur en benzène des différents organes à celle du sang, nous notons que le rapport est de 1,8 pour le foie. Ceci n'est pas surprenant, le foie fixant électivement un très grand nombre de substances toxiques.

La haute teneur en benzène du cerveau explique les accidents nerveux qui occupent le premier plan du tableau de l'intoxication aiguë. Enfin nous notons le taux élevé trouvé dans les surrénales. On pourrait invoquer la riche vascularisation des glandes à sécrétion interne, mais ce n'est certainement pas une raison suffisante, car nous n'avons pu déceler le benzène, ni dans les thyroïdes, ni dans les ovaires. La constitution de la glande elle-même, riche en lipides expliquerait mieux l'électivité du benzène pour les surrénales. Ce fait peut justifier les variations importantes de la glycémie, trouvées lors des intoxications réalisées chez nos Lapins.

2. — INTOXICATIONS SUBAIGUËS.

CHIEN II.

L'intoxication a été réalisée sur un Chien de 11 kg., 900 par inhalation d'une atmosphère titrant 26 mg. de benzène par litre.

Pendant la première heure, l'animal n'a pas réagi. Peu de temps après, nous notions une courte phase d'excitation avec tremblements et, rapidement, l'animal tombait sur le côté. La narcose a duré jusqu'à ce que l'animal soit sacrifié par saignée, neuf heures après le début de l'expérience.

Le benzène a été dosé dans le sang, dans les viscères et dans la moelle des os longs.

Les teneurs trouvées sont indiquées dans le tableau N° XXX.

TABLEAU N° XXX

Localisation du benzène dans l'intoxication subaiguë

Chien II

ORGANES OU TISSUS PRÉLEVÉS	POIDS du prélèvement en grammes	TAUX de benzène en mg. dans l'échantillon	TAUX de benzène en mg. par 100 g.	RÉSULTATS exprimés par rapport au taux du sang pris pour unité
Foie	235	27	11,5	1,8
Poumon	114	4	3,5	0,5
Reins	75	6	8	1,2
Rate	24	3,5	14,6	2,3
Cœur	90	12	13,3	2
Pancréas	29	8	27,6	4,3
Cerveau	56,5	7,5	13,2	2,1
Cervelet	6,82	1	14,7	2,3
Moëlle osseuse	1,57	2,5	159	24,9
Surrénales	1,66	2,5	150,6	23,5
Thyroïde	1,79	0,1	5,6	0,9
Testicules	20,5	1	4,9	0,8
Tissu adipeux	84,5	140	165,6	25,9
Bile	9,13	1,5	16,4	2,6
Sang	62,5	4	6,4	1

Le taux obtenu dans le sang est moins élevé que lors de l'intoxication suraiguë. Par contre, la teneur dans les organes est nettement plus forte. Ces faits illustrent parfaitement les différences que l'on peut observer dans les localisations après intoxication suraiguë d'une part, subaiguë d'autre part.

En effet, dans le premier cas, le toxique pénétrant massivement dans le sang, tue l'animal avant que le poison ne se soit fixé dans les organes.

Lorsque l'intoxication est subaiguë, ou plus généralement lorsque la mort survient après un laps de temps relativement long, le toxique se fixe dans les organes, en proportion variable, suivant son électivité pour telle ou telle cellule et sa teneur diminue dans le sang.

Trois localisations électives se dégagent, d'une façon tout à fait remarquable, de notre tableau : localisation portant sur la moelle osseuse, les surrénales, le tissu adipeux. Viennent ensuite, mais à un degré beaucoup moindre, le pancréas, la rate, le cerveau et le cervelet.

La teneur en benzène de la moelle osseuse comporte un enseignement et nous montre que, déjà, une intoxication de neuf heures touche le tissu sanguiformateur. Il y a donc une véritable affinité du benzène pour ces organes, ce qui explique l'hyperleucocytose importante trouvée lors de cette intoxication subaiguë et due à l'excitation des tissus sanguiformateurs.

Nous avons pu déceler le benzène dans les thyroïdes et les testicules ; nos investigations ont été négatives pour l'hypophyse, ceci peut être dû au faible volume de cette glande qui ne pesait que 0 g., 07.

La surrénale distance de loin les autres glandes endocrines, quant à la teneur en benzène. Ce fait est comparable à ce que nous avons trouvé lors de l'intoxication suraiguë.

Le taux de benzène est élevé dans le tissu adipeux, contrairement à ce qu'avait trouvé G. JOACHIMOGLU [107].

Nous trouvons dans la bile une teneur relativement forte, plus élevée que dans le foie, ceci nous indique que l'intoxication a atteint un nouveau stade, celui de l'élimination.

3. — INTOXICATION CHRONIQUE.

CHIEN V.

Un Chien a subi, pendant quatorze semaines, une intoxication chronique. Chaque jour, pendant quatre heures, puis huit heures pendant les deux dernières semaines, le Chien était mis dans la cage respiratoire où l'atmosphère avait une concentration en benzène de 16 mg., 6 par litre. Après une dernière séance d'inhalation de trois heures, l'animal a été sacrifié par ponction cardiaque.

Le benzène a été dosé dans les principaux organes et les taux trouvés sont indiqués dans le tableau N° XXXI.

TABLEAU N° XXXI

Localisation du benzène dans l'intoxication chronique

Chien V

ORGANES OU TISSUS PRÉLEVÉS	POIDS du prélèvement en grammes	TAUX de benzène en mg. dans l'échantillon	TAUX de benzène en mg. pour 100 g.	RÉSULTATS exprimés par rapport au taux du sang pris pour unité
Foie	317	20	6,3	3,6
Poumon	71	2	2,8	1,6
Reins	73,5	3,5	4,8	2,8
Rate	18	1	5,5	3,1
Cœur	60,5	4	6,6	3,8
Cerveau	65,5	3	4,6	2,6
Moëlle osseuse.....	1,7	0,5	29,4	16,8
Surrénales	1,4	0,1	7,1	4
Ovaires	0,85	0,05	5,9	3,4
Tissu adipeux.....	88	80	9,1	5,2
Bile	18	1,5	8,3	4,7
Sang	74	1,3	1,75	1

La teneur du sang est plus faible que celle de tous les autres tissus. C'est, nous le pensons, un bon critère des intoxications chroniques.

Le taux dans la moelle osseuse se détache nettement des autres. Cette localisation élective correspond aux modifications de la formule sanguine, trouvées chez ce Chien, modifications qui constituent l'élément principal et caractéristique de l'intoxication chronique.

Le taux du tissu adipeux est élevé, mais à un degré moindre que lors de l'intoxication subaiguë.

La haute teneur de la bile indique l'élimination du toxique par cette voie.

Le benzène a été décelé, en quantités appréciables, dans les surrénales et les ovaires, mais nous n'en avons pas trouvé dans les thyroïdes.

Cette étude de la localisation du benzène nous permet de tirer des conclusions très intéressantes et qui, par leur généralité, dépassent le cadre de l'intoxication benzénique. Si nous comparons les trois intoxications: suraiguë, subaiguë et chronique, nous constatons que, dans la première où la dose massive tue rapidement l'animal, le taux dans le sang est élevé. Dans le second cas, le benzène du sang circulant a eu le temps de se fixer sur les viscères où l'on en trouve des taux déjà importants.

Dans l'intoxication chronique cette fixation sur les organes s'est accentuée et ils en renferment des quantités plus fortes que le sang lui-même.

Un second point doit être souligné, c'est le rapport étroit existant entre la localisation du benzène et les effets toxiques constatés.

Dans l'intoxication aiguë, où les symptômes nerveux tiennent la première place, on voit le toxique se fixer électivement sur le cerveau. Dans l'intoxication chronique par contre, la moelle osseuse est de très loin la plus riche en benzène, ce qui cadre admirablement avec le fait que les modifications de la formule sanguine caractérisent cette intoxication.

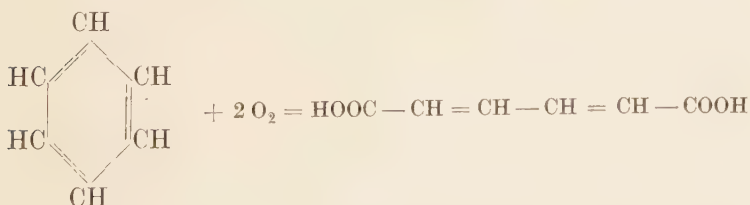
B. — Élimination

Si nous retrouvons des quantités notables de benzène dans les viscères après les intoxications relatées précédemment, il n'en est pas de même lorsque la recherche du toxique est pratiquée chez un animal tué plusieurs heures après inhalation, même si celle-ci avait été reproduite quotidiennement depuis plusieurs mois.

Le benzène s'élimine donc. Nous avons en effet noté, lors de toutes nos expériences, l'odeur caractéristique de l'air expiré par l'animal, odeur qui persiste plusieurs heures après la sortie de la cage.

L'élimination par voie respiratoire est, en effet, la plus importante, mais l'évacuation d'une partie du toxique par les excrétaats n'est cependant pas négligeable. C'est un fait, établi depuis longtemps, que le benzène est oxydé dans l'organisme en phénol et diphénols (pyrocatéchine et hydroquinone), ces produits étant éliminés par les urines, à l'état conjugué avec l'acide sulfurique ou l'acide glycuronique. Nous avons, en effet, constaté que, chez tous nos animaux intoxiqués, les urines prenaient à l'air une coloration foncée due à la formation de dérivés quinoniques.

L'oxydation peut être plus profonde avec ouverture de la chaîne et formation d'acide muconique, suivant l'équation



M. JAFFÉ [104], puis D. FUCHS et A. V. SOOS [73], ont pu démontrer sa présence en très faible quantité, 0,2 à 0,3 p. 100

du benzène ingéré, dans les urines d'animaux ayant reçu ce produit *per os* et chez des leucémiques en traitement.

Le pourcentage et la vitesse d'oxydation sont très variables suivant l'espèce considérée et la voie d'introduction et sont à peu près constants pour un même individu.

La proportion de phénol formé dans l'organisme à partir du benzène est, pour M. NENCKI et N. SIEBER [155], un test de l'intensité des phénomènes d'oxydation.

A partir des mêmes quantités de benzène, le Chien forme moins de phénol que l'Homme et le Lapin. Ceux-ci oxydent $1/4$ à $1/3$ du benzène absorbé et le Chien $1/7$ seulement. L'élimination urinaire des phénols, chez le Lapin, au cours de l'intoxication benzénique par voie respiratoire, a été étudiée par F. SARTORIUS et M. SUDHUES [178]. Ils ont montré que, pour une dose de 13 mg., 6 de benzène par litre, administrée quelques heures par jour, le taux des phénols urinaires éliminés, normalement de 2 mg. par litre, augmente fortement dès le début de l'intoxication, il peut atteindre 50 fois le taux normal. Si l'on arrête l'intoxication, la quantité de phénols éliminée diminue progressivement, le retour au chiffre normal n'a lieu qu'après 5 jours.

Le phénol ne s'élimine pas à l'état libre, mais combiné à l'acide sulfurique et à l'acide glycuronique, d'où des modifications du rapport du soufre minéral au soufre neutre ou conjugué, ce dernier augmentant considérablement.

I. SOHN [194], puis H. BORUTTAU et E. STADELMANN [18], signalent ce fait, dans l'urine des leucémiques traités par le benzène, en même temps que la diminution du rapport azoturique et la présence d'albumine.

E. H. CALLOW et T. S. HELE [24] retrouvent, chez des Chiens recevant le benzène par voie buccale, l'augmentation dans l'urine du soufre neutre et pensent qu'il y a formation d'acides mercapturiques. De plus, W. P. YANT et ses collaborateurs [217], dans des expériences sur le même animal, trouvent que la modification du rapport semble parallèle à la concentration du benzène

dans l'air respiré et pouvait être utilisée comme signe précoce du benzénisme chronique [216] [217].

Enfin, H. JOST [109] note, chez des ouvriers intoxiqués, l'augmentation du soufre neutre urinaire ainsi qu'une élévation du taux de l'acide glycuronique excrété.

Les auteurs ont étudié le mécanisme intime de la transformation du benzène dans l'organisme et ont recherché où se faisait l'oxydation. M. PÉRONNET [169], en particulier, a étudié les variations des phénols sanguins, chez le Lapin, au cours de l'intoxication par voie respiratoire.

Il n'a pu trouver d'augmentation de ces phénols, en raison du manque de sensibilité des méthodes de dosage.

Nous avons, chez nos animaux en expérience, recherché la présence de phénols dans l'urine. Celle-ci, préalablement acidifiée par l'acide phosphorique, était soumise à la distillation. Dans les premières portions, nous avons effectué les réactions classiques des phénols : précipitation par l'eau de brome, réaction de MILLON... L'intensité des réactions obtenues surpassait nettement celle donnée par les urines normales, qui ne contiennent que des traces de phénols.

Le benzène s'élimine donc par trois voies principales : voie respiratoire, la plus importante; voie urinaire, après oxydation en phénols et enfin par les fèces comme nous le montrent les quantités importantes de benzène trouvées dans la bile après intoxication.

*
* *

CONCLUSIONS



Un siècle après la découverte du benzène, son emploi s'était révélé suffisamment dangereux pour que la loi du 1^{er} Janvier 1931, classe, parmi les maladies professionnelles, celles engendrées par « la benzine brute ou rectifiée (C_6H_6 et homologues) ».

L'importance et le nombre des intoxications industrielles dues au benzène justifiait son étude toxicologique.

Nous avons, tout d'abord; recherché si, parmi les méthodes de dosage proposées, l'une d'entre elles pouvait nous donner des résultats satisfaisants et nous permettre de doser le benzène, dans l'atmosphère, d'une part, dans les tissus animaux, d'autre part.

Nous avons mis au point une méthode basée sur le fait que le benzène possède un spectre d'absorption dans l'ultra-violet permettant son identification. L'œil étant insensible à cette région du spectre, les mesures d'absorption ne peuvent pas se faire directement, mais les bandes sont facilement mises en évidence par la photographie. Sur la plaque, on obtient, après développement, une image présentant un noircissement variable avec les différentes longueurs d'onde envisagées et dépendant, pour certaines d'entre elles, de la concentration en benzène.

Il n'est malheureusement pas possible de déduire directement, du noircissement de la plaque en chaque point du spectre, l'intensité du rayonnement qui l'a impressionnée, de nombreuses causes extérieures influençant ce noircissement.

On ne peut donc envisager qu'un dosage comparatif.

Nous avons adopté le dispositif de R. FABRE et L. AMY [59] permettant d'affaiblir, dans des proportions connues, le noircissement donné par le témoin (alcool pur) et d'obtenir, pour

certain points, l'égalité de noircissement avec la solution à doser, d'où possibilité de déduire le titre de cette solution.

Nous avons appliqué cette méthode au dosage du benzène dans l'atmosphère, le sang et les organes.

Dans les deux derniers cas, le benzène se trouve fixé énergiquement sur les lipides, dont on ne peut le séparer que difficilement. La plupart des auteurs effectuent l'extraction par une simple distillation d'une bouillie aqueuse d'organes, mais ne vérifient leur méthode que sur des viscères additionnés de benzène. Si le rendement obtenu est ainsi relativement satisfaisant, il en est autrement lorsqu'ils opèrent sur des organes d'animaux intoxiqués où la fixation du solvant est infiniment plus intime. C'est pourquoi, nous avons repris l'étude de l'extraction du benzène des organes. Nous avons pu mettre au point le mode opératoire suivant : nous extrayons le benzène, d'une façon satisfaisante, par distillation après digestion préalable du sang ou des organes, dans une solution alcoolique d'acide picrique. Pour les tissus très riches en lipides et tout particulièrement pour la graisse, il est indispensable d'utiliser une solution de titre alcoolique élevé.

Possédant une méthode de dosage susceptible d'être appliquée à la toxicologie nous avons entrepris l'expérimentation sur l'animal.

Nous avons dû, tout d'abord, choisir le toxique à utiliser afin de réaliser des intoxications benzéniques typiques.

Dans l'industrie, elles se produisent généralement, par inhalation de benzol, produit impur de composition très variable, dont deux échantillons peuvent être très différents l'un de l'autre. Or, il est établi que, dans le benzol, le constituant auquel sont dus les accidents toxiques est le benzène, corps parfaitement défini. C'est donc ce dernier que nous avons utilisé pour reproduire les intoxications.

Un autre point devait être fixé, la voie d'introduction. La plupart des auteurs qui ont réalisé des intoxications benzéniques expérimentales ont utilisé la voie sous-cutanée. Quoique ce mode d'administration donne des résultats expérimentaux satisfaisants nous avons préféré employer la voie respiratoire, les

intoxications industrielles se faisant toujours par inhalation du toxique. Nous avons réalisé un dispositif permettant de telles intoxications, dans les conditions les plus favorables, en renouvelant constamment l'atmosphère toxique dont la concentration, soigneusement déterminée, était constante pendant la durée de l'expérience.

Désirant obtenir des intoxications aiguës et des intoxications chroniques, nous avons établi, pour les unes comme pour les autres, la dose nécessaire pour produire, chez un animal donné, l'effet désiré. Ayant enfin, mis au point les techniques hématologiques et chimiques que nous utiliserions pour déterminer les modifications sanguines produites, nous avons pu aborder l'étude complète et minutieuse des intoxications benzéniques expérimentales.

Les intoxications aiguës ont été réalisées sur le Chien et le Cobaye.

Les intoxications chroniques ont été entreprises successivement sur le Chien, le Lapin, le Cobaye et le Rat.

Nous avons noté, tout d'abord, des différences notables dans le comportement des diverses espèces animales vis-à-vis du benzène ; le Lapin et le Rat se montrant nettement plus sensibles. Sur le Chien plus résistant, nous avons pu néanmoins réaliser une intoxication typique.

Outre les symptômes classiquement décrits, nous avons constaté chez tous les animaux des modifications sanguines importantes. Nous ne pouvons pas reprendre en détail les résultats obtenus, mais nous tenons à souligner deux points : tout d'abord, l'abaissement constant de la calcémie et ensuite, une augmentation des lipides allant de pair avec une hypercholestérolémie notable. Nous pouvons attribuer les changements observés à l'intoxication benzénique car celle-ci était signée par une leucopénie qui, on le sait, est caractéristique.

Enfin l'étude de la localisation du benzène, dans les organes des animaux intoxiqués, nous a permis de mettre en évidence le rôle indiscutable joué par les glandes endocrines et tout particulièrement par la surrénale dont le taux en benzène est

toujours très élevé. D'autre part, nous avons pu montrer l'électivité du toxique pour le tissu graisseux.

Des conclusions d'un ordre beaucoup plus général se dégagent de notre étude sur la localisation du benzène.

Au fur et à mesure que la durée de l'intoxication se prolonge, la répartition du benzène dans l'organisme se modifie. Dans l'intoxication suraiguë, la teneur du sang en benzène est relativement élevée, elle diminue d'autant plus que la mort survient plus tardivement, le toxique se répartissant alors dans les différents viscères. Dans les intoxications chroniques le taux de benzène d'un organe quelconque est plus élevé que celui du sang.

L'électivité du poison pour le système nerveux, lors des intoxications aiguës, et pour la moelle osseuse, lors des intoxications chroniques, est nettement mise en évidence et ceci cadre parfaitement avec les symptômes observés : excitation puis narcose, dans le premier cas, modification de la formule sanguine dans le second.

*
* *

VU, bon à imprimer :
Le Président de la Thèse,
P. LEBEAU.

VU :
Le Doyen de la Faculté,
PAUL GUÉRIN.

VU et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

1. ADLER-HERZMARK. — Die Benzolvergiftung in Wiener-Neustadt. (*Zentralb. f. die ges. hyg.*, 1931, **23**, 637.)
2. ADLER-HERZMARK, JENNY und SALINGER (A.). — Untersuchungen von Wiener Arbeitern, die mit Benzol, Toluol und Xylolartigen Materialien beschäftigt sind. (*Arch. f. Gewerbepath. u. Gewerbehyg.*, 1931, **1**, 763-790.)
3. ADNOT (A.). — Contribution à l'étude des protides du sérum. Dosage de la globuline et de la sérine par une nouvelle méthode. (*Thèse Doct. Méd.* Strasbourg, 1931, p. 75.)
4. AGASSE-LAFONT (E.). — Intoxications mortelles par le benzène. Les purpuras toxiques méconnus. (*Clinique et Laboratoire*, 1933, **12**, 232-235.)
 AGASSE-LAFONT (E.). — Caractères hématologiques des purpuras toxiques provoqués par le benzène, la benzine et le benzol. (*Clinique et Laboratoire*, 1934, **13**, 17-20.)
5. AGASSE-LAFONT (E.) et HEIM (F.). — Réactions hématiques du benzinisme professionnel. (*Bull. Acad. Méd.*, 1911, **65**, 320.)
6. ANDERSEN (D.H.). — Benzol poisoning with hyperplasia of the bone marrow (*Amer. Journ. of Pathol.*, 1934, **10**, 101-111).
7. BAMESREITER (O.). — Neue Versuche über die quantitative Giftigkeit von Benzol und Benzindämpfen. (*Arch. f. Hyg.*, 1932, **108**, 129-134.)
8. BARZILAI (G.). — Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Benzols während der Schwangerschaft (*Bull. Soc. Ital. Biol. speriment.*, 1933, **8**, 1388-1392, d'après *Chem. Zentralb.*, 1935, 3567).
9. BATCHELOR (J.J.). — The relative toxicity of benzol and its higher homologues. (*Amer. Journ. Hyg.*, 1927, **7**, 276-298.)
10. BENECH. — Action physiologique de la benzine. (*Rec. Mém. de Méd. milit.*, 1879, **35**, 81-91.)
11. BERGAUS (A.). — Cité par Mitnik et Genkin [153].
12. BEYER (G.). — Chronische Benzolvergiftung bei Kaninchen. Beobachtungen am Blutbild. (*Ztschr. Ges. exp. Med.*, 1933, **91**, 410-416.)
13. BIBEL. — Un nouvel appareil pour la détermination automatique dans l'air des vapeurs combustibles (essence, benzène, éther, etc.) (*Zentralb. Gewerbehyg. Unfallverh.*, 1927, **14**, 291-293, d'après *Chim. et Ind.*, 1928, **19**, 1067.)

14. BICKERT (F.W.). — Untersuchungen über den Einfluss gewerblicher Gifte auf die Immunkörperbildung. (*Arch. f. Hyg.*, 1932, **107**, 1-10.)
15. BINET (L.). — Quelques questions physiologiques d'actualité. Etude expérimentale des hémorragies. (*Masson*, Paris, 1927. p. 79-83.)
16. BINET (L.) et FOURNIER (B.). — La réaction splénique de la saignée, (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 1141.)
17. BORGOMANO (J.). — Leucémies et benzène (*Thèse Doct. Méd. Lyon*, 1928.)
18. BORUTTAU (H.) und STADELMANN (E.). — Beiträge zur den chemischen Grundlagen der Benzolbehandlung der Leukämie. (*Biochem. Ztschr.*, 1914, **61**, 372-386.)
19. BREWER (R.K.) and WEISKOTTEN (H.G.). — The action of benzol. III. The urinary phenols with special reference to the diphasic leucopenia. (*Journ. Med. research*, 1916, **35**, 71.)
20. BREZINA (E.) und SCHMIDT (W.). — Versuche über die Wirkung von Absaugevorrichtungen. (*Arch. f. Gewerbepath. u. Gewerbehyg.*, 1934, **5**, 382-400.)
21. BRIGGS (A.P.). — A modification of the Bell-Doisy phosphate method. (*Journ. Biol. Chem.*, 1922, **53**, 13-16.)
22. BROUSSELOWSKA (A.). — Sur la sensibilité différente des divers animaux aux anesthésiques. (*C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 893.)
23. BURREL (G.A.), SEIBERT (F.M.) and ROBERTSON (I.W.). — Analysis of natural gas and illuminating gas by fractional distillation at low temperatures and pressures. (*Techn. paper 104 U.S. Bureau of Mines*, 1915, p. 16.)
24. CALLOW (E.H.) and HELE (T.S.). — LXXIX - Studies on the sulfur metabolism of the dog. III. The effect of benzene and of some derivatives of benzene on sulfur metabolism. (*Biochem. Journ.*, 1926, **20**, 598-605.)
25. CAMP (W.E.) and BAUMGARTNER (E.A.). — Inflammatory reactions in rabbits with a severe leucopenia. (*Journ. of exper. Med.*, 1915, **22**, 197.)
26. CASTELLINO (N.). — Benzolismo professionale. (*Rassegna d. previd. sociale*, Roma, 1934, **21**, 9.)
27. CAVAGLIANO. — La riserva alcalina nel benzolismo cronico sperimentale. (*Med. del Lavoro*, 1932, **23**, 238-243.)
28. CERSUNI (C.V.) et BROUSSELOWSKA (A.). — Coefficient de répartition des vapeurs de certaines substances organiques volatiles entre l'air alvéolaire et le sang artériel. Ether, benzène, toluène et benzine. (*Arch. Intern. Pharmacodyn. et Thérap.*, 1935, **52**, 354-358.)
29. CHAMBOVET (L.). — Intoxications par le benzène. (*Thèse Méd. Lyon*, 1922.)

30. CHASSAVANT (A.). — Procédé de recherche et de dosage des vapeurs de benzine dans l'atmosphère. (*C. R. Soc. Biol.*, 1905, **58**, 1009.)
31. CHASSAVANT (A.) et GARNIER (M.). — Toxicité du benzène et de quelques hydrocarbures aromatiques homologues. (*C. R. Soc. Biol.*, 1903, **55**, 1255.)
32. CHASSAVANT (A.) et GARNIER (M.). — Rapport entre la constitution chimique des corps et leur toxicité dans la série aromatique (benzène et ses dérivés). (*Arch. Intern. Pharmacol.*, 1905, **14**, 93.)
33. CHAVASSIEU et MOREL. — Sur une réaction colorée des sucres réducteurs donnée par le m. dinitrobenzène en milieu alcalin. (*C. R. Ac. Sc.*, 1906, **143**, 966.)
34. COOK (W. A.) and FICKLEN (J. B.). — Determination of benzene in solvent mixtures. (*Indust. engin. chem. analytic Edit.*, 1932, **4**, 406-408.)
35. COOK (W. A.) and FICKLEN (J. B.). — The determination of benzene in air. (*Journ. Indust. Hyg.*, 1935, **17**, 41-47.)
36. CUVELIER (R.) et PATOIR (G.). — La régénération des albumines du sérum sanguin après la saignée chez le chien. (*C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 16.)
37. DANIELOPOLU (D.), MARCÔU (I), PETRESCO (M.) et GINGOLF (N.). — Sur les accidents produits par le benzène et par les substances médicamenteuses contenant un noyau benzénique. (*Bull. de l'Office Intern. d'Hyg. publ.*, 1935, **28**, 699-722.)
38. DAUTREBANDE (L.). — La paralysie périphérique du système vaso-moteur par le benzol. (*Arch. Intern. Pharmacodyn. et Thérap.*, 1933, **44**, 394-413.)
39. DAUTREBANDE (L.). — La paralysie du système vaso-moteur par les solvants volatils industriels. (*Presse Médicale* n° 54, 6 Juillet 1935.)
40. DELORÉ (P.) et BORGOMANO (J.). — Leucémie aiguë au cours de l'intoxication benzénique. Sur l'origine toxique de certaines leucémies aiguës et leurs relations avec les anémies graves. (*Journ. Méd. de Lyon*, 1928, **9**, 227.)
41. DENNIS (L. M.) and Mc CARTHY (E. S.). — The determination of benzene in illuminating gas. (*Journ. amer. chem. soc.*, 1908, **30**, 233-247.)
42. DIMMEL (H.). — Zur Klinik der chronischen Benzolvergiftung. (*Arch. f. Gewerbepath. u. Gewerbehyg.*, 1933, **4**, 414-464.)
43. DI PRISCO. — Effet du benzène sur le pouvoir lipocytyque du sérum sanguin. (*Morgagni*, 1933, **75**, 227-231, cité par Castellino [26].)
44. DOMMER (O.). — Ein neuer Registrierapparat zur selbsttätigen Bestimmung von brennbaren Dämpfen (Benzin, Benzol, Äther usw.). (*Chem. Zeitg.*, 1927, **51**, 413.)
45. DUKE (W. W.). — Causes of variation in the platelet count. (*Arch. Intern. Méd.*, 1913, **11**, 100-120.)

46. DUMAS (G.). — Les intoxications par les produits benzéniques, benzène, benzols et benzines. (*Thèse Doct. Méd.*, Nancy, 1934.)
47. DURIEZ (A.). — Les hémopathies benzoliques. (*Thèse Doct. Méd.*, Paris, 1933.)
48. DUVOIR (M.). — Les maladies professionnelles causées par la manipulation des hydrocarbures et de leurs principaux dérivés. (*Ann. Méd. légale*, 1928, **8**, 453-468.)
49. DUVOIR (M.), POLLET (L.), KREIS (B.) et GREENE (J. L.). — Deux cas mortels d'intoxication benzolique professionnelle. (*Ann. Méd. légale*, 1935, **15**, 692-700.)
50. ELLINGER (A.). — Aromatische Kohlenwasserstoffe... (*in Heftter Handb. exp. Pharmacol. Springer*, Berlin, 1923, **1**, 871-880.)
51. ELLIOT (B. S.) and DALTON (M. C.). — The estimation of small quantities of acetone, alcohol and benzene in air. (*The Analyst*. 1919, **44**, 132-136.)
52. ENGELHARDT (W.E.). — Vergleichende Tierversuche über die Blutwirkung von Benzin und Benzol. (*Arch. f. Gewerbepath. u. Gewerbehyg.*, 1931, **2**, 479-514.)
53. ENGELHARDT (W. E.) und ESTLER (W.). — Versuche über die akutnarkotische Wirkung aliphatischer und aromatischer Kohlenwasserstoffe. (*Arch. f. hyg.*, 1935, **114**, 249-260.)
54. ENGLISH (F. L.). — The analysis of aromatic nitrocompounds by means of titanous chloride. (*Journ. ind. eng. Chem.*, 1920, **12**, 994-997.)
55. ESTLER (W.). — Versuche über die akutnarkotische Wirkung aliphatischer und aromatischer Kohlenwasserstoffe. (*Arch. f. hyg.*, 1935, **114**, 261-271.)
56. FABRE (R.). — Orientation moderne de la Toxicologie (*Assoc. franç. avanc. Sc. Congrès de Chambéry*, Juillet 1933.)
57. FABRE (R.). — Altérations du sang dans les intoxications professionnelles. (*Hermann, édit.*, Paris, 1935.)
58. FABRE (R.). — Leçons de Toxicologie. (*Hermann, édit.*, Paris, 1935.)
59. FABRE (R.) et AMY (L.). — Un nouveau dispositif pour la mesure de l'absorption dans l'ultra-violet. (*Journ. Pharm. Chim.*, 1935, **22**, 5-15.)
60. FAURE-BAULIEU (M.) et LÉVY-BRUHL (M.). — Les altérations sanguines dans l'intoxication benzénique. (*Ann. de Méd.*, 1924, **15**, 97-110.)
61. FÉLIX. — (1872), cité par Lazarew [126.]
62. FERGUSON (T.), HAREY (W. F.) and HAMILTON (T. D.). — An enquiry into the relative toxicity of benzene and toluene. (*Journ. of Hyg.*, 1933, **33**, 547-575.)

63. FLANDIN (C.) et ROBERTI (J.). — Purpura hémorragique mortel dû à une intoxication professionnelle par les vapeurs de benzol. (*Bull. Mém. Soc. méd. Hôp. de Paris*, 1922, **46**, 58.)
64. FLEURY (P.). — Fiches techniques de Chimie biologique. (*Édit. Véga*, Paris, 1933.)
65. FLEURY (P.) et MARQUE (J.). — Technique pour le dosage du sucre sanguin par la méthode de Baudouin et Lewin. (*Journ. Pharm. Chim.*, 1929, **10**, 364-367.)
66. FLEURY (P.) et MARQUE (J.). — Le dosage du fer sanguin par molybdomanganimétrie. Nouvelle technique. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, 1123-1129.)
67. FLORENTIN (D.) et VANDENBERGHE (H.). — Contribution à l'étude de la réduction des dérivés nitrés aromatiques par les chlorures stanneux et titaneux et à leur dosage volumétrique. (*Bull. Soc. Chim.*, 1920, **27**, 158-166.)
68. FLURY (F.) und ZERNIK (F.). — Schädliche Gase, Dämpfe, Nebel, Rauch- und Staubarten. (*Springer*, Berlin, 1931, p. 277.)
69. FONTANA (G.). — New researches on the blood and the bloodforming organs in benzol intoxication. (*Giornale di Clin. Med.*, 1921, n° 3, d'après *Abst. Journ. Indust. hyg.* 1921-1922, **3**, 183.)
70. FORBES (H.S.) and HOMPE (L.). — Carbon monoxide. illuminating gas and benzol: their effect on blood coagulation time. (*Journ. Indust. Hyg.*, 1921-1922, **3**, 211-216.)
71. FORESTIER (J.). — L'épreuve de la sédimentation des hématies par la méthode de Westergren. (*Monde Médical*, Paris 1931, n° 794.)
72. FRIEMANN. — Zur Diagnose der chronischen Benzolvergiftung. (*Arch. f. Gewerbepath. u. Gewerbehyg.*, 1936, **7**, 278-283.)
73. FUCHS (B.) und SOOS (A. V.). — Ueber die Verbrennung des Benzols im Organismus des Menschen. (*Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1916, **96**, 11-13.)
74. FÜHNER (H.). — Die narkotische Wirkung des Benzins und seiner Bestandteile (Pentan, Hexan, Heptan, Octan.). (*Biochem. Ztschr.*, 1921, **115**, 235-261.)
75. FÜHNER (H.). — Die Wirkungstärke der Narcotica. (*Biochem. Ztschr.*, 1921, **120**, 143-163.)
76. FULWEILER (W. H.) and BARNES (J.). — A source of light giving a continuous spectrum in the ultra-violet. (*Journ. Franklin Inst.* July 1922.)
77. GADASKIN (I. D.). — Ueber die Umwandlung des Benzols im Organismus und Methoden zur Bestimmung desselben. (*Biochem. Ztschr.*, 1928, **198**, 149-156.)
78. GAVRILOV (A. A.). — A colorimetric process for the determination of benzene in air. (*Journ. chem. Ind. Moscow*, 1931, **8**, n° 23-24, 26-29, d'après *Chem. Abstr.*, 1932, **26**, 3.457.)

79. GETTLER (A. O.). — On the detection of benzene in cadavers. (*Journ. Pharmacol. and exper. Therap.*, 1923, **21**, 161-164.)
80. GREENBURG (L.). — Benzol poisoning as an industrial hazard. (*U. S. Publ. Health rep.*, 1926, **41**, 1357-1375, 1410-1431, 1516-1539.)
81. GRIFFON (H.). — Contribution à l'étude du microdosage du potassium. Applications biochimiques. (*Thèse Pharm. Sup.*, Lyon, 1928.)
82. GRIGAUT (A.), BOUTROUX (A.) et CODOUNIS (A.). — Le dosage des protéines du sérum sanguin par précipitation alcoolique. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1930, **12**, 20-24.)
83. GUILLAUMIN (Ch.-O.). — Influence de quelques anticoagulants sur la répartition entre plasma et globules des constituants sanguins. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1930, **12**, 491-503.)
Le sodium globulaire du sang humain. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **19**, 441-445.)
84. GUILLAUMIN (Ch.-O.). — Calcium et calcémie chez l'homme. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1932, **14**, 85-196.)
85. HALPHEN (G.). — Recherche de la benzine dans les alcools régénérés. (*Journ. Pharm. Chim.*, 1900, **11**, 373-375.)
86. HAMILTON (A.). — The growing menace of benzene (benzol) poisoning in american industry. (*Journ. Amer. Med. Assoc.*, 1922, **78**, 627-630.)
87. HAMILTON (A.). — The lessening menace of benzol poisoning in american industry. (*Journ. Indust. Hyg.*, 1928, **10**, 227-233.)
88. HAMILTON (A.). — Industrial poisons in the United States. (*New-York., Macmillan and Co*, 1929, 451-481.)
89. HAMILTON (A.). — Benzene (benzol) poisoning. (*Arch. of Pathol.*, 1931, **11**, 434-454, 601-637.)
90. HARBECK (E.) und LUNGE (G.). — Quantitative Scheidung von Äthylen und Benzoldampf (*Zeit. f. angew. Chem.*, 1896, **21**, 675.)
91. HARRINGTON (T. F.). — Industrial benzol poisoning in Massachusetts. (*Boston Med. and Surg. Journ.*, 1917, **177**, 203-206.)
92. HARRIS (B. R.). — The influence of benzol upon certain aspects of metabolism. (*Journ. Indust. Hyg.*, 1923, **4**, 1923.)
93. HEIM DE BALSAC (F.). — Généralisation des emplois industriels du benzène. Ses dangers. Précautions nécessaires. (*Mouv. sanit.*, 1934, **11**, 233-237.)
94. HEIM DE BALSAC (F.) et AGASSE-LAFONT (E.). — Intoxications mortelles de gravité variable, en série, par l'emploi d'un adhésif solubilisé par le benzène. Indications prophylactiques. (*Bull. Acad. Méd.*, 1933, **110**, 31-35.)
95. HEIM DE BALSAC (F.), AGASSE-LAFONT (E.) et FEIL (A.). — Le benzolisme chronique professionnel dans l'industrie du caoutchouc. (*Presse médicale*, 7 Juin 1924, 497.)

96. HEKTOEN (L.). — The effect of benzene on the production of antibodies. (*Journ. Infect. Dis.*, 1916, **19**, 69-84.)
97. HENDERSON (Y.) and HAGGARD (H. W.). — Noxious gas, and the principles of respiration influencing their action. (*The chemical catalog. Co Inc. New-York*, 1927.)
98. HENRI (V.). — Etude des spectres d'absorption et de fluorescence du benzène. (*Journ. Phys. et Radium*, 1922, **3**, 181-211.)
99. HENRI (V.). — In « International Critical Tables by Washburn ».
100. HULTGREN (G.). — Action du benzol sur la teneur du sang en thrombocytes, leucocytes et érythrocytes. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 1060.)
101. HULTGREN (G.). — Importance du mode d'introduction du benzol sur les éléments figurés du sang. (*C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 1063.)
102. HURWITZ (S. H.) and DRINKER (C. K.). — The factors of coagulation in the experimental aplastic anemia of benzol poisoning with special reference to the origin of prothrombin. (*Journ. Exper. Med.*, 1915, **21**, 401-424.)
103. *Hygiène du Travail*. — Bureau Int. du Travail. (Genève 1925, Fasc. 8, Benzène.)
104. JAFFÉ (M.). — Ueber die Aufspaltung des Benzolrings im Organismus. (*Ztschr. f. physiol. Chem.*, 1909, **62**, 58-67.)
105. JANOWSKY (J. V.). — Ueber eine Reaction der Dinitrokörper. (*Ber. chem. Ges.*, 1891, **24**, 971-972.)
106. JESPERSEN (K.). — Einfall von benzolbehandelter Leukämie mit eigentümlichen Verlauf. (*Deutsch. med. Wchnschr.*, 1913, **39**, 1300.)
107. JOACHIMOGLU (G.). — Ueber den Nachweis des Benzols in Organen und seine Verteilung im Organismus. (*Biochem. Ztschr.*, 1915, **70**, 93-104.)
108. JONES (G. W.) and YANT (W. P.). — Detection of small quantities of petroleum vapor with the Burrel methane indicator. (*Technical paper n° 352. Depart. of Int. U. S., Bureau of Mines*, 1924.)
109. JOST (H.). — Harn untersuchungen bei chronischer Schädigung. (*Arch. f. Gewerbepath. u. Gewerbehyg.*, 1932, **3**, 791-797.)
110. KAHANE (E.). — Le dosage du sodium par la méthode à l'uranyle. (*Bull. Soc. Chim.*, 1930, **47**, 382-404.)
111. KALOPOS (I.). — L'effet du benzol dans la leucémie. (*Orsori Hetilap*, Budapest, 1935, **79**, 1092-1096.)
112. KAYSER (F.). — Dosage rapide des protéines dans le sérum sanguin. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1930, **12**, 533-537.)
113. KIRALYFI (G.). — Das Benzol in der Therapie der Leukämie. (*Wien. med. Wchnschr.*, 1912, **25**, 1311-1318.)

114. KLIENEBERGER (C.) und CARL (W.). — Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere. (*Johann Ambrosius Barth*, Leipzig, 1927.)
115. KOBERT. — Lehrbuch der Intoxikationen (*Stuttgart*, 1906).
116. KOPPENHÖFER (G. F.). — Morphologische und Chemische Untersuchung bei einem Fall einer tödlichen akuten Benzolvergiftung. (*Arch. f. Gewerbepath. u. Gewerbehyg.*, 1935, **6**, 417-427.)
117. KORANYI (A. V.). — Die Beeinflussung der Leukämie durch Benzol. (*Berl. Klin. Wchnschr.*, 1912, **49**, 1357.)
118. KRIEGER (A.). — Benzolbestimmung im Gase. (*Chem. Zeitg.*, 1922, **46**, 468.)
119. LANDE (K.) und KALINOWSKY (L.). — Zur Klinik der gewerblichen Berufskrankheiten durch Benzol. (*Med. Klin.*, 1928, **24**, 655-658.)
120. LANGLOIS (J. P.) et DESBOUIS (G.). — Des effets des vapeurs hydrocarbonées sur le sang. (*Journ. Physiol. Pathol. gén.*, 1907, **9**, 253-260.)
121. LAUNOY (L.) et LÉVY-BRUHL (M.). — De l'action comparée du benzène et du cyclohexane sur les organes hématopoiétiques. (*C. R. Soc. Biol.*, 1920, **83**, 215.)
122. LAUNOY (L.) et LÉVY-BRUHL (M.). — De l'action comparée du benzène et du cyclohexane sur les éléments figurés du sang. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1920, **2**, 145-149.)
123. LAURIAN (P.). — Sur le spectre d'absorption ultra-violette du benzène. Son utilisation pour la recherche et le dosage de faibles quantités de benzène dans l'atmosphère. (*XIV^e Congrès Chim. ind.*, Paris, 1934.)
124. LAZAREW (N. W.). — Ueber die Giftigkeit verschiedener Kohlenwasserstoffedampfe. (*Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol.*, 1929, **143**, 223-233.)
125. LAZAREW (N. W.). — Intensité d'action des anesthésiques en fonction de leur état « lié » ou dissous dans le sang. (*C. R. Soc. Biol.*, 1936, **122**, 891.)
126. LAZAREW (N. W.), BRÜLLOWA (L. P.), BRUSILOWSKAJA (A. J.) et LARIONOW (L.). — Benzine, poison industriel, 1931. (en russe.)
127. LAZAREW (N. W.), BRUSILOWSKAJA (A. J.) und LAWROW (J. N.). — Benzin und Benzolgehalt des Blutes bei verschiedenartiger Einführung dieser Gifte in den Organismus. (*Biochem. Ztschr.*, 1931, **242**, 377-384.)
128. LAZAREW (N. W.), BRUSILOWSKAJA (A. J.) und LAWROW (J. N.). — Quantitative Bestimmung einiger flüchtiger Stoffe im Blut. (*Biochem. Ztschr.*, 1931, **240**, 12-18.)
129. LAZAREW (N. W.), BRUSILOWSKAJA (A. J.), LAWROW (J. N.) und LIFSCHITZ (F. B.). — Ueber die Durchlässigkeit der Haut für Benzin und Benzol. (*Arch. f. Hyg.*, 1931, **106**, 112-122.)

130. LEBEAU (P.) et COURTOIS (G.). — Traité de Pharmacie chimique. (Masson, Éd., Paris, 1929.)
131. LEBEAU (P.) et DAMIENS (A.). — Sur une méthode générale d'analyse des mélanges gazeux. (*Ann. de Chim.*, 1917, **8**, 221-265.)
132. LEGGE (M. T.). — Chronic benzol poisoning. (*Journ. Indust. hyg.*, 1920, **1**, 539-541.)
133. LEHMANN (K. B.), GUNDERMANN, STÖHN (O.) und KLEINER (R.). — Quantitative Untersuchungen über die Aufnahme von Benzol durch Tier und Mensch aus der Luft. (*Arch. f. Hyg.*, 1910, **72**, 307-326.)
134. LEHMANN (K. B.); WEISSEMBERG (R.), von WOJCIECKOWSKI (A.), LUIG und GUNDERMANN. — Experimentelle Studien über den Einflusstechnisch und hygienisch wichtiger Gase und Dämpfe auf den Organismus. (*Arch. f. Hyg.*, 1912, **75**, 1-119.)
135. LENOIR et CLAUDE. — Sur un cas de purpura attribué à l'intoxication par le benzène. (*Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. de Paris*, 1897, **14**, 125.)
136. LEULIER (A.), VELLUZ (L.) et GRIFFON (H.). — Sur le microdosage du potassium dans les milieux biologiques. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1928, **10**, 1238.)
137. LÉVY (M.). — Note sur le dosage du chlore dans le sérum sanguin et les globules. (*Bull. Soc. Chim. biol.*, 1929, **11**, 633-634.)
138. LÉVY-BRUHL (M.). — L'action leucotoxique du benzène. Les applications à la pathologie générale et à la thérapeutique. (*Biol. Méd.*, 1921, **12**, 423-444.)
139. LEWIN (L.). — Die akute tödliche Vergiftung durch Benzoldampf. (*München med. Wchnschr.*, 1907, **54**, 2377-2379.)
140. LIFSCHIZ (I. J.). — Influence of temperature on the toxicity of benzene. (*Gigiena truda i tek bezopasnosti*, 1935, n° 4, 12-14, d'après *Abstr. Indust. Hyg. Journ. Toxicol.*, 1936, **18**.)
141. LIGNAC (G. O. E.). — Die Benzoleukämie bei Menschen und weiben Mäusen (*Krankheits Forschung*, 1932, **9**, 403-453 et *Klin. Wchnschr.* 1933, **12**, 109.)
142. LUIG (B.). — Beiträge zur Schwefelkohlenstoff und Benzolvergiftung in akuten und chronischen Versuchen. (*Thèse Würzburg*, 1913. Cité par Flury [68].)
143. LUSZCZAK (A.). — Die Spektrographie im Dienste der Gewerbehygien Bestimmung von Benzol, Toluol und Xylol in der Raumluft (*Wien. Med. Wchnschr.*, 1936, **86**, 91, 127, 150.)
144. MAC CORD (C. P.). — The present status of benzene (benzol) poisoning. (*Journ. amer. med. assoc.*, 1929, **93**, 280-283.)
145. MAC CORD (C. P.). — Benzol (Benzene) poisoning. (*The industrial Health conservancy laboratories*, Cincinnati, Ohio, 1932.)
146. MARTLAND (H. S.). — 1915, cité par Hamilton [89].

147. MATWEJEW (S. P.), PRONIN (Y. B.) et FROST (O. Y.). — Méthode de dosage continu des vapeurs de benzène dans l'air. *Journ. f. prakt. Chem.*, 1931, **3**, 1223-1232. (en russe), cité par Lazarew [128].)
148. MEDA (G.). — Il benzolismo Professionale. (*Il Lavoro*, 1922, **13**, 264, 297, 326, 363. Cité par Hamilton [89].)
149. MERKLEN (P.), LE BRETON (E.) et ADNOT (A.). — Méthode de dosage de l'albumine et de la globuline sériques sans emploi d'électrolytes précipitants (*C. R. Soc. Biol.*, 1931, **107**, 758.)
150. MEYER (S.). — Changes in the blood as reflecting industrial damage. (*Journ. indust. hyg.*, 1928, **10**, 29-55.)
151. MEYER (S.) und SCHNEIDER (A.). — Periodische Untersuchung von arbeiten laugende Blutuntersuchungen bei Benzolarbeiten (*Arch. f. Gewerbepath. u. Gewerbehyg.*, 1933, **4**, 480-485.)
152. MGEBROW (M. L.). — Materialien zum Studium der Wirkung einiger Destillationprodukte des Bakuer Naphta auf den tierischen Organismus. (*Virchow's Archiv.*, 1930, **278**, 610-622.)
153. MITNIK (P.) und GENKIN (S.). — Zur Klinik der chronischen Benzolvergiftung. (*Arch. f. Gewerbepath. u. Gewerbehyg.*, 1931, **2**, 457-478.)
154. MOREL (A.) et MARTHOUD (R.). — Sur diverses réactions colorées données par les dinitrobenzènes. (*Bull. Soc. Chim.*, 1935, **2**, (5^e s.), 949.)
155. NENCKI (M.) und SIEBER (N.). — Ueber eine neue Methode die physiologische Oxydation zu messen und über den Einfluss der Gift und Krankheiten auf dieselbe. (*Pflügers Arch.*, 1883, **31**, 319-326.)
156. NEUMANN (W.). — Experimentelles zur Wirkung des Benzols. (*Deutsch. med. Wchnschr.*, 1915, **41**, 394-396.)
157. NIKOLAJEW (N. M.) et SCHPARO (L. A.). — Studien über Benzolwirkung auf den tierschen Organismus. (*Virchow's archiv.*, 1929, **272**, 123-150.)
158. NIKULINA (M.) and GETMANN (Z.). — The effect of benzol on the fats and lipoids of the blood. (*Gigiena bezopasn. i. patol. truda.*, 1934, **3**, 11-17, d'après *Abstr. Journ. Indust. Hyg.*, 1934, **16**, 121.)
159. NIKULINA (M. M.) et TITOWA (A. N.). — Sbornik rabot po professionalnoy patologii e profkonsultazie. (Repts. of Invest.) (*Leningrad Inst. for Inverst. of indust. Diseases*, 1934, **8**, 80-84, d'après *Abstr. Journ. Indust. Hyg.*, 1935, **17**, 51.)
160. ORNDORFF (W. R.), GIBBS (R. C.), Mc NULTY (S. A.) and SHAPIRO (C. V.). — The absorption spectra of benzene and toluene in alcoholic solution. The spectrographic detection of benzene as an impurety inorganic compounds. (*Journ. Amer. Chim. Soc.*, 1928, **50**, 831-837.)
161. OVARY (Z.). — Contribution à l'étude des anémies benzoliques professionnelles. (*Thèse Doct. Méd. Paris*, 1935.)

162. ORZECZOWSKI (G.). — Chronische Benzolvergiftung und Knochenmark. (*Virchow's Arch.*, 1929, **271**, 191-193.)
163. PACU (M. M.). — Contribution à l'étude des éléments inorganiques du sang. (*Thèse Doct. Pharm.* Paris, 1932.)
164. PAPPENHEIM (A.). — Experimentelle Beiträge zur neueren Leukämie Therapie. (*Ztschr. f. exper. Pathol. u. Therapie*, 1914, **15**, 39-85.)
165. PAUL (W. D.), FRIEDLÄNDER (A.) and Mc CORD (C. P.). — Basophilic material in benzol poisoning. (*Journ. Indust. Hyg.*, 1927, **9**, 193-208.)
166. PEARCE (S. J.), SCHRENK (H. H.) and YANT (W. P.). — Microcolorimetric determination of benzene in blood and urine. (*U. S. Bureau of Mines, Rept. Invest.*, 1936, n° 3302.)
167. PELTZER (J.). — Microchemische Farbereaktion des m. Dinitrobenzol zum forensischen Nachweis des Benzols. (*Chem. Zeitg.*, 1933, **57**, 162.)
168. PÉRONNET (M.). — Recherches sur le dosage du benzène en toxicologie. II. Méthode de dosage dans le sang. III. Méthode de dosage dans les organes. (*Journ. Pharm. Chim.*, 1934, **20**, 195-206, 244-248.)
169. PÉRONNET (M.). — Recherches sur l'intoxication expérimentale par la vapeur de benzène. Concentration du toxique dans le sang et vitesse de disparition. (*Journ. Pharm. Chim.*, 1935, **21**, 503-513.)
170. PÉRONNET (M.) et TRUHAUT (R.). — Sur les réactions de coloration fournies par le métadinitrobenzène en milieu alcalin. Application au dosage des vapeurs de benzène dans une atmosphère. (*Bull. Soc. Chim.*, 1933, **53**, 1464-1474.)
171. PFEIFFER (O.). — Bestimmung von Benzoldampf in Leuchtgas. (*Chem. Zeitg.*, 1904, **28**, 884.)
172. PUGLIESE (A.). — Comparative investigations of the toxicity of some samples of benzene and particularly of solutions of rubber in benzene for use on fabrics. (*Rend. ist. lombardo Sci.*, 1922, **55**, 404, d'après *Chem. Abstr.* 1923, **17**, 1516.)
- Experimental investigations of the toxic action of benzine, petroleum, ether and toluene. (*Rend. ist. lombardo Sci.*, 1922, **55**, 443, d'après *Chem. Abstr.*, 1923, **17**, 1517.)
173. RAMBOUSEK (J.). — Gewerbliche Vergiftungen. (Leipzig, 1911, 258-259.)
174. RUSK (G. Y.). — The effect of benzol intoxication and consequent leucopenia on the formation of artificial hemolysins and precipitins. (*Univ. Calif. Publications Pathology*, 1914, **2**, 139.)
175. SAINTE CLAIRE-DEVILLE (H.). — Manuel de Chimie gazière, 1921, p. 65.

176. SANNIÉ (M. C.). — Microphotomètre photoélectrique enregistreur sans fente ni amplificateur. (*C. R. Ac. Sc.*, 1934, **198**, 1149.)
177. SANTESSON (C. G.). — Ueber chronische Vergiftungen mit Steinkohlen-theer-benzin. Vier Tödesfalle (*Arch. f. Hyg.*, 1897, **31**, 336-376.)
178. SARTORIUS (F.) und SUDHUES (M.). — Studien bei experimenteller chronischer Benzolvergiftung. (*Arch. f. Hyg.* 1933, **110**, 245-265.)
179. SCHIFF (F.). — Einfluss des Benzols auf die aktive Anaphylaxie des Meerschweinchens (*Zeit. f. Immunität*, 1914, **23**, 61.)
180. SCHMITZ (E.). — Zur chemischen Diagnose der akuten Benzolvergiftung. (*Deutsch. med. Wchnschr.*, 1915, **41**, 1250.)
181. SCHOU (S. A.) — Spektrographi og dens Betydning for Teori og praksis (*Dansk. Tids. Farm.*, 1926, **14**, 419-428.)
182. SCHRENK (H. H.), PEARCE (S. J.) and Yant (W. P.). — A microcolorimetric method for the determination of benzene. (*U. S. Bureau of Mines Rept. Invest.*, 1935, N° 3.287, 1-11.)
183. SCHULLOVA. — Cité par Mitnik [153].
184. SCHULTZ (F.). — Détermination du benzène et du toluène dans les gaz (*Coll. Trav. chim. Tchécoslov.*, 1929, **1**, 228, d'après *Bull. Soc. Chim.* 1929, **46**, 1426.)
185. SELLING (L.). — A preliminary report of some cases of purpura hemorrhagica due to benzol poisoning. (*Johns Hopkins Hosp. Bull.*, 1910, **21**, 33-37.)
186. SELLING (L.). — Benzol als Leucotoxin. (*Beitr. path. Anat. allg. Path.*, 1911, **51**, 576-631.)
187. SHACHNOVSKAIA (S. B.). — Permeability of the hemato-encephalic barrier and blood changes in experimental benzene poisoning (*Gigiena truda i Tek Bezopasnosti*, 1936, n° 2, 30-34, d'après *Abstr. Journ. Industr. Hyg. toxicol.* 1936, **13**, 155.)
188. SIMONDS (J. P.) and JONES (H. M.). — The effects of injections of benzol upon the formation of antibodies. (*Journ. Med. research*, 1915, **33**, 197.)
189. SIMONIN. — Intoxication par ingestion accidentelle de benzène (*Bull. Mém. Soc. méd. Hôp. de Paris*, 1903, **20**, 199.)
190. SMITH (A. R.). — Chronic benzol poisoning among women industrial workers. (*Journ. Industr. Hyg.*, 1928, **10**, 73-93.)
191. SMYTH (H. F.) — The toxicity of certain benzene derivatives and related compounds. (*Journ. Indust. Hyg.*, 1931, **13**, 87-96.)
192. SMYTH (H. F.) and SMYTH (H. F. jr.). — Spray painting hazards as determined by the Pennsylvania and the National Safety Council surveys. (*Journ. indust. Hyg.*, 1928, **10**, 163-192.)
193. SMYTH (H. F. jr.). — The determination of small amounts of benzene vapors in air. (*Journ. Indust. Hyg.*, 1929, **11**, 338-348 et 1931, **13**, 227-232.)

194. SOHN (I.). — Ueber die Beeinflussung des Stoffwechsels durch Benzol sammt Bemerkungen über seine Darreichung bei der Leukämie. (*Wien. Klin. Wchnschr.*, 1913, **26**, 573-575.)
195. SZECSENYI-NAGY (L. VON). — Zur Lävulosereaktion mit Dinitrobenzolin. (*Biochem. Zeit.*, 1935, **281**, 175-177.)
196. SZECSENYI-NAGY (L. VON). — Quantitative Benzolbestimmung mit Hilfe des Pulfrichschen Stufenphotometers. (*Biochem. Zeit.*, 1935, **281**, 178-180.)
197. TELEKY (D.). — Die Chronische Benzolvergiftung. (*Klin. Wchnschr.*, 1933, **1**, 472.)
198. TELEKY (L.) und WEINER (E.). — Ueber Benzolvergiftung. (*Klin. Wchnschr.*, 1924, **3**, 226-228.)
199. TRUHAUT (R.). — Sur les réactions de coloration fournies par les dinitrobenzènes en milieu alcalin. (*Journ. Pharm. Chim.*, 1937, **25**, (8^e s.), 216-222.)
200. TSCHERNIKOFF (A. M.), GADASKIN (I. D.) und KOWSCHAR (F. W.). — Zur Toxicologie des Benzols. (*Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmacol.*, 1931, **161**, 214-228.)
201. UNDERHILL (F. P.) and HARRIS (B.). — The influence of benzol upon certain aspects of metabolism. (*Journ. Indust. Hyg.*, 1923, **4**, 491-500.)
202. VAQUEZ (H.) et YACQEL (J.). — Traitement des leucémies par le benzol. (*Bull. Mém. Soc. méd. Hôp. de Paris*, 1918, **42**, 68.)
203. WALLBACH. — Veränderungen der bakteriellen Leucocytose durch Benzol und der Thorium. (*Zeit. Ges. exp. Med.*, 1922, **82**, 40-52.)
204. WEIL (P. E.). — La leucémie post-benzolique. (*Bull. Mém. Soc. méd. Hôp. de Paris*, 1932, **56**, 193-198.)
205. WEISKOTTEN (H. G.). — The action of benzol. IX. The normal life, span of the neutrophile leucocyte. (*Amer. Journ. of Pathol.*, 1930, **6**, 183-190.)
206. WEISKOTTEN (H. G.), GIBBS, BOGGS (E. O.) and TEMPLETON (E. R.). — The action of benzol. VI. Benzol vapor leucopenia. (*Journ. med. research.*, 1920, **41**, 425-438.)
207. WEISKOTTEN (H. G.), SCHWARTZ (S. C.) and STEENSLAND (H. S.). — The action of benzol. I. On the significance of myeloid metaplasia of the spleen. (*Journ. Med. research.*, 1915, **33**, 127-140.) II. The deutero-phase of the diphasic leucopenia and antigen-antibody reaction. (*ibid.* 1916, **35**, 63-78.)
208. WEISKOTTEN (H. G.) and STEENSLAND (H. S.). — The action of benzol. IV. Spontaneous infections with special reference to the diphasic leucopenia. (*Journ. Med. research.*, 1917, **37**, 215-223.) V. The diphasic leucopenia as a polynuclear amphophile phenomenon, (*ibid.* 1919, **39**, 485-494.)

209. WEISKOTTEN (H. G.), WYATT (T. C.) and GIBBS. — The action of benzol. VII. Thrombocytopenia and thrombocytosis coincident with marrow necrosis and marrow regeneration. (*Journ. Med. research*, 1924, **44**, 593-599.)
 210. WHITE (W. C.) and GAMMON (A. M.). — The influence of benzol inhalations on experimental pulmonary tuberculosis in rabbits. (*Trans. Assoc. Amer. Physiol.*, 1914, **29**, 332.)
 211. WINSLOW (C-E. A.). — Summary of the National Safety Council. Study of benzol poisoning. (*Journ. indust. Hyg.*, 1927, **9**, 61-74.)
 212. WINTERNITZ (M. C.) and HIRSCHFELDER (A. D.). — Studies upon experimental pneumonia in rabbits. (*Journ. ex. med.* 1913, **18**, 50.)
 213. WORONOW (A.). — Ueber die morphologischen Veränderungen des Blutes und der Bluterzeugenden Organe unter dem Einflusse des Benzols und dessen Abkömmlinge. (*Virchow's Arch.*, 1929, **271**, 173-190.)
 214. YANT (W. P.) and FREY (F. E.). — Apparatus for preparing vapor air mixtures of constant composition. (*Journ. ind. eng. Chem.*, 1925, **17**, 692.)
 215. YANT (W. P.), SCHRENK (H. H.) and MAUTZ (P. H.). — Méthode de dosage de petites quantités de benzène dans les produits biologiques. (*U. S. Bureau of Mines Rep. Invest.*, 1935, No 3282, d'après *Chimie et Industrie*, 1936, 1087.)
 216. YANT (W. P.), SCHRENK (H. H.) and PATTY (F. A.). — A plant study of urine sulfate determinations as a measure of benzene exposure. (*Journ. Industr. Hyg. Toxicol.*, 1936, **18**, 349-356.)
 217. YANT (W. P.), SCHRENK (H. H.), SAYERS (R. R.), HORVATH (A. A.) and REINAHRT (W. H.). Urine sulfate determinations as a measure of benzene exposure. (*Journ. Industr. Hyg. Toxicol.*, 1936, **18**, 69-88.)
-

TABLE DES FIGURES

	PAGES
FIG. 1. — Dispositif utilisé pour le dosage spectrographique du benzène.....	63
FIG. 2. — Courbe d'absorption dans l'ultra-violet du benzène en solution alcoolique.....	67
FIG. 3. — Spectrogrammes d'une solution alcoolique de benzène à 0,50 p. 1.000 sous 20 mm. comparés à ceux de l'alcool pur. Technique des spectres imbriqués.....	68
FIG. 4. — Appareil pour la séparation du benzène d'une atmosphère au moyen de la condensation par le froid en présence d'alcool.....	72
FIG. 5. — Spectrogrammes montrant la séparation du benzène d'une atmosphère par le froid.....	74
FIG. 6. — Appareil distillatoire utilisé pour les petits organes	75
FIG. 7. — Appareil de Schloesing.....	77
FIG. 8. — Schéma de l'appareil utilisé pour réaliser les intoxications expérimentales par inhalation de vapeurs de benzène.....	111
FIG. 9. — Variations du taux des éléments sanguins et du poids, au cours de l'intoxication chronique réalisée sur le chien.....	160
FIG. 10. — Variations du taux des éléments sanguins, du calcium et du cholestérol, au cours de l'intoxication chronique réalisée sur le chien.....	166
FIG. 11. — Variations du taux des éléments sanguins, du calcium et du cholestérol, au cours de l'intoxication chronique réalisée sur le chien.....	172

TABLE DES MATIÈRES

	PAGES
<i>Introduction</i>	11
 PREMIÈRE PARTIE. — GÉNÉRALITÉS.....	17
Intoxications industrielles	21
Prophylaxie de l'intoxication benzénique industrielle.....	28
Intoxications thérapeutiques	30
 DEUXIÈME PARTIE. — IDENTIFICATION ET DOSAGE DU BEN- ZÈNE EN TOXICOLOGIE	33
 Chapitre I. — <i>Techniques de dosage du benzène applicables à la toxicologie</i>	35
1. — Dosage du benzène dans l'atmosphère	38
A. Méthodes basées sur les propriétés physiques du benzène	38
I. — Condensation du benzène à basse température	38
II. — Dissolution du benzène	39
III. — Adsorption du benzène	39
IV. — Rapport de la viscosité au poids spécifique	39
V. — Réfractométrie. Interférométrie	40

	PAGES
B. Méthodes basées sur les propriétés chimiques du benzène.....	41
I. — Nitration du benzène.....	41
a) Réaction de Chavassieu et Morel..	42
b) Réaction de Janowsky.....	42
c) Réaction de Halphen.....	42
1° Pesée du dinitrobenzène formé.....	42
2° Réduction des groupements nitrés....	43
A) Méthodes volumétriques.....	43
B) Méthodes colorimétriques.....	45
a) Méthode de Gadaskin.....	45
b) Méthode de Gavrilov.....	45
3° Dosages basés sur les réactions colorées du dinitro benzène.....	45
a) Méthode de Péronnet et Truhaut..	45
b) Méthode de Von Szecsenyi-Nagy..	46
c) Méthode de Schrenk, Pearce et Yant.....	46
II. — Combustion du benzène.....	47
III. — Oxydation du benzène.....	48
IV. — Formation du dérivé hexabromé....	48
V. — Absorption du benzène par le cyanure de nickel ammoniacal.....	49
2. — Dosage du benzène dans le sang et les organes...	50
Méthode dérivée de la réaction de Halphen, utilisée par Gadaskin.....	50
I. — Méthodes par distillation.....	51
Méthode de Joachimoglu.....	51
Méthode de Von Szecsenyi-Nagy...	52
II. — Entraînement du benzène du sang, par un courant d'air.....	52
Méthode de Lazarew.....	52
Méthode de Péronnet.....	53
III. — Distillation suivie d'entraînement par l'air du benzène du distillat.....	54

	PAGES
Chapitre II. — <i>Mise au point d'une méthode spectrographique de dosage du benzène dans l'atmosphère, le sang et les organes.</i>	57
1. -- Source lumineuse	62
2. — Cuves.....	62
3. — Spectrographe	62
4. — Appareil producteur d'étincelles de haute fréquence pour l'obtention des raies d'émission du fer...	64
5. — Dispositif d'absorption de R. Fabre et L. Amy ..	64
Etude qualitative	65
Etude quantitative	67
Application de la technique proposée à la recherche et au dosage du benzène dans une atmosphère.	72
Application de la méthode proposée au dosage du benzène dans les organes.	75
Extraction du benzène du sang.....	82
Extraction du benzène de la graisse.....	83
Prélèvement des organes.....	84
Matériel	85
Mode opératoire.....	85
Avantages de ce dosage.....	86
 TROISIÈME PARTIE. — INTOXICATIONS EXPÉRIMENTALES.....	 87
Chapitre I. — <i>Toxicité comparée du benzène et de ses homologues</i> <i>Choix du toxique utilisé dans nos expériences .</i>	93
Chapitre II. — <i>Influence de la voie d'introduction. Choix du mode d'intoxication</i>	99
Chapitre III. — <i>Dispositif expérimental utilisé pour l'intoxication par inhalation</i>	107
Obtention d'une atmosphère de concentration fixe en benzène.....	112
Cage respiratoire.....	113
Conditions de vie des animaux à l'intérieur de la cage	114
Chapitre IV. — <i>Choix de l'animal</i>	117

Chapitre V. — <i>Doses de benzène utilisées dans les intoxications expérimentales</i>	125
Intoxications aiguës.....	127
Intoxications chroniques	129
Chapitre VI. — <i>Techniques hématologiques et chimiques utilisées</i>	133
I. — Examens hématologiques.....	135
II. — Examens chimiques du sang	137
A. — Examens pratiqués sur le sérum..	139
1 ^o Dosage de l'urée.....	139
2 ^o Dosage du cholestérol total ...	139
3 ^o Dosage du calcium	139
4 ^o Dosage des protides totaux...	139
5 ^o Dosage des polypeptides.....	140
6 ^o Dosage des lipides totaux.....	141
7 ^o Recherches des pigments biliaires	141
B. — Examen effectué sur le plasma fluoré	142
Dosage du phosphore minéral...	142
C. — Examens pratiqués sur le sang total fluoré	142
1 ^o Détermination de la glycémie ..	142
2 ^o Dosage du fer.....	142
D. — Examens pratiqués dans le plasma et le sang total.....	143
1 ^o Dosage du chlore	143
2 ^o Dosage du sodium	143
3 ^o Dosage du potassium.....	143
III. — Examen des urines	144
1 ^o Recherche de l'albumine.....	145
2 ^o Recherche du glucose.....	145
3 ^o Recherche des corps cétoniques.	145
4 ^o Recherche des pigments et des acides biliaires.....	145
5 ^o Recherche des phénols.....	145
6 ^o Recherche du sang dans l'urine.	146
7 ^o Dosage des chlorures	146

	PAGES
Chapitre VII. — <i>Intoxications aiguës</i>	147
1 ^o Intoxications suraiguës	149
2 ^o Intoxications subaiguës	151
Chapitre VIII. — <i>Intoxications chroniques</i>	155
1 ^o Intoxications chroniques réalisées sur le Chien	157
2 ^o Intoxications chroniques réalisées sur le Lapin	174
3 ^o Intoxications chroniques réalisées sur le Cobaye	185
4 ^o Intoxications chroniques réalisées sur le Rat	185
Chapitre IX. — <i>Sort du benzène dans l'organisme</i>	195
A. — Localisation	197
1 ^o Intoxications aiguës	199
1 ^o Intoxications suraiguës	199
2 ^o Intoxications subaiguës	201
3 ^o Intoxication chronique	203
B. — Élimination	205
<i>Conclusions</i>	209
Bibliographie	215
Table des figures	229

— L I L L E —

IMPRIMERIE L. DANIEL

93, RUE NATIONALE, 93
